

THÈSES
PRÉSENTÉES A
LA FACULTÉ DES SCIENCES DE PARIS
POUR L'OBTENTION DU TITRE
de **DOCTEUR de l'UNIVERSITÉ**
de **PARIS**
(MENTION SCIENCES)

PAR
M. François MORDRET

1^{re} THÈSE

**ÉTUDE DE L'INSAPONIFIABLE DES HUILES
DE COLZA, SOJA ET TOURNESOL**

2^e THÈSE

**DOSAGE DES TRACES MÉTALLIQUES
DANS LES CORPS GRAS
PAR SPECTROPHOTOMÉTRIE D'ABSORPTION ATOMIQUE**

Soutenues le 6 juillet 1971 devant la Commission composée de :

MM. G. CHAMPETIER	<i>Président</i>
P. DESNUELLE P. FRÉON	} <i>Examineurs</i>
M. NAUDET J. P. WOLFF	
	} <i>Invités</i>

THÈSES
PRÉSENTÉES A
LA FACULTÉ DES SCIENCES DE PARIS
POUR L'OBTENTION DU TITRE
de **DOCTEUR de l'UNIVERSITÉ**
de **PARIS**
(MENTION SCIENCES)

PAR
M. François MORDRET

1^{re} THÈSE
ÉTUDE DE L'INSAPONIFIABLE DES HUILES
DE COLZA, SOJA ET TOURNESOL

2^e THÈSE
DOSAGE DES TRACES MÉTALLIQUES
DANS LES CORPS GRAS
PAR SPECTROPHOTOMÉTRIE D'ABSORPTION ATOMIQUE

Soutenues le 6 juillet 1971 devant la Commission composée de :

MM. G. CHAMPETIER	<i>Président</i>
P. DESNUELLE P. FRÉON	} <i>Examineurs</i>
M. NAUDET J. P. WOLFF	} <i>Invités</i>



1^{re} THÈSE

**ÉTUDE DE L'INSAPONIFIABLE DES HUILES
DE COLZA, SOJA ET TOURNESOL**



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41551512_0015

REMERCIEMENTS

-:-:-

Je remercie Monsieur le Professeur CHAMPETIER, Membre de l'Institut, d'avoir bien voulu me faire l'honneur de présider mon Jury de thèse malgré ses activités nombreuses et astreignantes.

Je remercie Messieurs les Professeurs DESNUELLE, FREON, NAUDET, qui après m'avoir confié ce travail, en ont suivi l'exécution et ont accepté d'être Membres du Jury.

Je remercie Monsieur J.P. WOLFF, Directeur de l'Ecole Supérieure d'Application des Corps Gras, qui tout au long de cette étude me fit si souvent bénéficier de ses précieux conseils et de sa grande expérience.

Que Monsieur HELME, Directeur Général de l'Institut des Corps Gras, soit assuré de ma reconnaissance pour la confiance qu'il m'accorda et les moyens qu'il mit à ma disposition.

Que Messieurs GOURY, GUILLAUMIN, PREVOT, UZZAN reçoivent tous mes remerciements, ainsi que le Personnel de l'Institut des Corps Gras, car chacun à sa façon et selon sa spécialité m'apporta son aide.

Que Madame JOUETRE, qui a eu l'ingrate tâche de déchiffrer et de dactylographier mon manuscrit, trouve ici l'expression de ma gratitude.

F.M.

S O M M A I R E

	Pages
<u>CHAPITRE I</u>	
. Introduction	9
. Comparaison de quelques méthodes d'obtention de l'insaponifiable	11
<u>CHAPITRE II</u>	
. Fractionnement chromatographique de l'insaponifiable	23
<u>CHAPITRE III</u>	
. Etude des constituants de l'insaponifiable	37
. Les hydrocarbures	30
. Les alcools	44
. Les stéroïdes	50
. Les méthylstéroïdes	61
. Les cétones terpéniques	66
. Les pigments	69
. Les tocophérols	75
<u>CONCLUSION</u>	80
<u>ANNEXE EXPERIMENTALE</u>	91
<u>BIBLIOGRAPHIE</u>	113

CHAPITRE I

INTRODUCTION

Du point de vue chimique, une huile végétale est un mélange complexe et une première simplification pour son étude consiste à grouper ses constituants selon leur nature : glycéridique ou non glycéridique. Il est alors possible de distinguer :

Une fraction glycéridique équivalente en poids à environ 98 % du corps gras et renfermant principalement des triglycérides.

Une fraction non glycéridique mineure, caractérisée par le grand nombre et la variété de ses composants, dont certains sont présents en tant que traces.

Les constituants non glycéridiques affectent l'état ou le devenir de l'huile qui les contient. Les uns sont responsables de sa couleur (pigments), de sa flaveur (aldéhydes, cétones) ; d'autres possèdent une valeur biologique reconnue (β carotène) et interviennent dans la conservation du corps gras (tocophérols) ; enfin, quelques-uns, sans rôle apparent (stérols, alcools), existent souvent en proportions suffisamment définies pour représenter de précieux critères analytiques.

L'étude détaillée de cette fraction se heurte à une double difficulté : ses constituants sont mineurs et liposolubles. Par la saponification, les triglycérides sont transformés en savons et glycérol ; il est alors possible d'extraire et de concentrer une matière dénommée "insaponifiable". Bien que l'insaponifiable ne soit pas identique dans sa composition à la fraction non glycéridique, il s'en rapproche car il renferme une majorité de constituants naturellement présents dans l'huile (hydrocarbures, stérols, tocophérols) et des substances résultant de la saponification de certains esters non glycéridiques (esters de stérols, de monoalcools). Seuls les composés les plus fragiles sont détruits ou éliminés par le traitement alcalin (chlorophylles, pigments phénoliques). L'examen de l'insaponifiable est d'un grand intérêt si l'on désire mieux connaître les constituants mineurs d'une huile.

L'analyse de l'insaponifiable d'une huile d'arachide a été réalisée par WALBECQ (1) à une époque où ce corps gras était très largement distribué sur le marché national. Actuellement, des impératifs économiques favorisent une ten-

COMPARAISON DE QUELQUES METHODES D'OBTENTION
DE L'INSAPONIFIABLE

La nécessité de mettre facilement en évidence des adjonctions d'huiles minérales aux corps gras alimentaires est à l'origine de la détermination de la teneur en "matière non saponifiable". En 1881, ALLEN et THOMSON (25) décrivent une méthode dont le principe est conservé dans la plupart des méthodes normalisées actuelles. Schématiquement, nous la résumons ainsi : Le corps gras est saponifié par une solution hydroalcoolique de potasse caustique. La solution savonneuse est extraite par un solvant convenable, les extraits subissent des lavages répétés pour les débarrasser des savons ou acides gras qu'ils peuvent encore contenir ; enfin, le solvant est éliminé et le résidu (l'insaponifiable) est séché puis pesé. Mais une telle méthode a aussi l'avantage d'être préparative et peut constituer la première étape d'une analyse détaillée des constituants mineurs. Il est alors important de définir les meilleures conditions de récupération de ces composés, celles-ci ne coïncidant du reste pas nécessairement avec les prescriptions des méthodes normalisées.

TABLEAU I

Teneurs en insaponifiable selon différents auteurs

Auteurs	H u i l e s			Observations
	Colza	Soja	Tournesol	
ANDRE (24)	1 + 0,37	0,81 + 0,28		Insaponifiable extrait à l'éther éthylique "Insaponifiable résistant"
DUBINSKAYA (27)			2 0,8-1,08	Début de développement de la graine Graine mûre
FEDELI (28)	0,8	0,7	0,6	Huiles extraites au laboratoire
" (29)		0,93 13		Huile de cotylédon Huile de germe
KAUFMANN (19)	1,2			
JACKY (30)			0,7	Huile de graines cultivées en HONGRIE
MELCION (22)			0,85	Huile de pression
NIEWIADOMSKI (21)	0,91 1,31			Huile de pression Huile d'extraction
RUTKOWSKI (23)	0,89 0,78 0,75			Huile brute Huile raffinée Huile hydrogénée
VOROBÉV (31)		1,02-1,34		Huile de graines cultivées en URSS
WOLFF (32)	0,5-1,5	0,7 - 2	0,5 - 2,5	Limites inférieures et supérieures enregistrées à la suite d'un grand nombre d'analyses

- En premier lieu, nous avons préparé les insaponifiables des huiles brutes (pression ou extraction) en utilisant les deux méthodes de la Norme française NF T 60-205 (26). A titre indicatif, nous résumons dans le Tableau I les résultats de divers travaux, montrant bien que, pour une huile donnée, la teneur en insaponifiable est une donnée analytique dont l'amplitude normale est dépendante de l'origine de l'huile et de ses antécédents technologiques.

- Ensuite, dans une série d'essais ayant pour but d'améliorer les taux de récupération de l'insaponifiable, nous avons cherché à préciser l'incidence qualitative et quantitative de variantes qui ont été proposées au niveau de la saponification (à froid, rapide), de l'extraction (savons secs, extracteurs continus) ou du lavage.

- Enfin, nous avons mis en oeuvre quelques techniques générales de purification (cristallisation) et de fractionnement (distillation moléculaire) du corps gras, au cours desquelles les non glycérides se concentrent préférentiellement dans l'une des phases ou fractions qui sera alors saponifiée.

A. PREPARATION DES INSAPONIFIABLES

SELON LA NORME FRANCAISE

Deux méthodes sont proposées, différentes entre elles par le solvant d'extraction. La méthode A utilise l'hexane, la méthode B l'oxyde d'éthyle.

Pour cinq échantillons analysés, les résultats sont les suivants :

TABLEAU II

Huile	Méthode A	Méthode B
• Colza pression	0,62	1,02
• Colza extraction	1,08	1,40
Colza pression	0,61	0,88
Soja pression	0,54	0,75
Tournesol pression	0,48	0,67
• Proviennent du même lot de graines		

Interprétation

1. Quantitative

Les chiffres varient selon la méthode de dosage adoptée. La méthode à l'hexane donne toujours des valeurs inférieures à celles que l'on obtient en prenant l'oxyde d'éthyle, et il a été démontré par WALBECQ (1) que cette différence ne tient pas seulement à l'extraction mais aux lavages qui lui font suite, le mélange eau-alcool (1 : 1) entraînant des quantités importantes de consti-

tuants polaires (alcools, stérols). Si, conventionnellement, les deux méthodes de la Norme française ont le même intérêt, on choisira l'éther de pétrole pour des mesures de contrôle (aspect de sécurité) alors que, pour une analyse des constituants de l'insaponifiable, il sera indispensable de récupérer une matière la plus représentative possible et, pour ce faire, la méthode à l'oxyde d'éthyle est préférable. Nous l'utiliserons donc par la suite mais, dans le cas des hydrocarbures, les deux méthodes seront de nouveau comparées.

2. Qualitative

Les insaponifiables des deux huiles de colza (pression et extraction) ont été comparés à l'aide de la chromatographie sur couche mince (C.C.M.). Les plaques, après développement et révélation destructive (H_2SO_4 1/2 concentré), présentent plusieurs bandes représentatives de familles de constituants, les principales ayant été identifiées par co-migration latérale de substances de référence. Nous remarquons que :

- les insaponifiables des deux huiles, extraits à l'oxyde d'éthyle, sont assez semblables ;
- la méthode à l'hexane appliquée à l'huile de pression s'accompagne d'une perte de produits de polarité intermédiaire alors que, dans le cas de l'huile

TABLEAU III

Influence de la saponification, de l'extraction et du lavage
sur la récupération de l'insaponifiable de l'huile de colza

Saponification	Extraction	Lavages	Résultats
Norme A ° Norme B °°	Norme A Norme B	Norme A Norme B	0,62 1,02
A froid, 12 heures Potasse concentrée, 3 minutes		Passage sur micro-colonne AL_2O_3	1,07 1,00
Norme B - - - - - Norme A	Liquide-solide (savon de baryum) Liquide-liquide Extracteur Jalade Extracteur Walbecq Extracteur Walbecq modifié Extracteur proposé Appareil de Craig Appareil de Craig	Norme B - - - - Norme A	1,00 ± 0,27 1,03 1,01 1,05 1,05 0,90 0,71
Norme A - Norme B	Norme A 7 extractions en ampoule Norme B	Eau-alcool 10 % Eau-alcool 10 % Eau seule (10 fois)	0,97 0,99

° Norme A : Norme française NF T 60-205 - méthode à l'hexane

°° Norme B : " - méthode à l'oxyde d'éthyle

le d'extraction, il y a enrichissement au niveau des alcools triterpéniques et une meilleure solubilisation des pigments hydrocarbures (tache importante à ce niveau).

B. MODIFICATIONS PROPOSEES A LA

SAPONIFICATION

La saponification d'un corps gras en milieu éthanolique se décompose en deux réactions successives :

- éthanolyse du triglycéride avec formation d'esters éthyliques et de glycérol ;
- saponification des esters éthyliques.

La vitesse de réaction dépend de la température, de la concentration en agent alcalin, mais paraît indépendante de sa nature. On pourra jouer sur ces deux paramètres selon la fragilité de certains constituants vis-à-vis des agents alcalins ou de leur thermolabilité.

1. Saponification à froid

Elle est recommandée lorsqu'il y a risque d'isomérisation ou de décomposition thermique, ce qui est le cas avec les pigments. On effectue la saponification à température ordinaire, avec agitation et sous azote ; la réaction n'est totale qu'au bout de plusieurs heures de contact. CAPELLA et al. (34) préparent ainsi l'insaponifiable de plusieurs huiles par un traitement avec la potasse alcoolique 2 N. La saponification à froid nous a donné un résultat légèrement supérieur à celui que nous avons choisi comme valeur de référence (Tableau III) et cette différence s'explique en considérant que, dans de telles conditions, certains esters (esters de stérols, cires) ne sont que très partiellement saponifiés.

2. Saponification rapide en présence de potasse concentrée

Cette méthode, mise au point pour l'étude des tocophérols et reprise par l'Analytical Methods Committee (35), réduit appréciablement le temps nécessaire à la préparation de l'insaponifiable puisque la saponification ne dure que trois minutes et que les extraits ne subissent que des lavages à l'eau.

L'analyse par C.C.M. montre que l'insaponifiable contient encore des acides gras et ceci se traduit par un résultat pondéral supérieur à la valeur de référence. Avec une prise d'essai plus importante (5 g au lieu de 1 g) et une purification finale sur microcolonne d'alumine, nous avons observé une assez bonne concordance des valeurs. Un dosage rapide de l'insaponifiable peut être ainsi réalisé.

C. MODIFICATION DE L'EXTRACTION

1. L'extraction solide-liquide

Le partage des constituants de l'insaponifiable entre solution hydroalcoolique et solvant laisse prévoir un état d'équilibre final et une limite de l'extraction qui ne pourra être dépassée sans modifier les conditions opératoires. Pour réduire cet inconvénient, plusieurs chercheurs ont étudié l'obtention et l'extraction de savons secs.

a) Savons de baryum

Dans leurs travaux sur les insaponifiables des huiles de crucifères, ANDRE et al. (24) ont démontré qu'à la suite de l'échange liquide-liquide en ampoule, on pouvait former par double décomposition des savons alcalino-terreux peu solubles dans l'eau et l'alcool. L'extraction de ces savons secs à chaud par l'acétone donne ce que les auteurs dénomment l'"insaponifiable résistant", et qui représente, dans le cas de l'huile de colza de pression, 27 % de l'insaponifiable normal. Par C.C.M., nous avons mis en évidence la nature de cette fraction, principalement constituée d'hydrocarbures et en moindre part de stérols.

b) Savons de potassium

En l'appliquant à l'huile de colza, nous avons repris le procédé décrit par SCHWARZ et al. (36) destiné au dosage de l'insaponifiable de l'huile de beurre. Après saponification par la potasse aqueuse avec le minimum d'eau, le savon sec est dispersé sur support inerte puis extrait à froid avec du benzène par percolation. La récupération de l'insaponifiable n'est que partielle, en raison des difficultés de filtration mais, qualitativement, le produit obtenu est assez représentatif et s'apparente à l'insaponifiable extrait par l'éther de pétrole. C'est une méthode rapide (moins d'une heure).

2 L'extraction liquide-liquide à chaud

Suivant les directives de la Norme, l'extraction de la solution savonneuse se fait en ampoule à décanter par trois portions identiques de solvant. Bien que cette opération soit simple, à froid il peut y avoir certaines difficultés pour obtenir rapidement une bonne décantation (cas des huiles brutes riches en phospholipides favorisant la formation d'émulsions) ou solubiliser des constituants de haut poids moléculaire (alcools supérieurs, cires). Plusieurs auteurs s'inspirant de l'appareil décrit par HILDITCH (37) pratiquent l'extraction liquide-liquide à chaud en continu à l'aide d'un matériel de leur conception. Différents par leur principe de fonctionnement et leurs possibilités, nous avons comparé deux types d'extracteur et, dégagant les avantages de chacun, nous avons d'abord apporté une amélioration sur l'un d'entre eux avant de mettre au point un modèle que nous présentons ici.

a) Dans l'appareil de JALADE modifié par UCCIANI et al. (38), le solvant d'extraction (éther éthylique par exemple) est vaporisé et se condense dans un réfrigérant dont le reflux alimente régulièrement un perfuseur. Celui-ci est constitué d'une tulipe à longue tige dont l'extrémité plonge dans la solution savonneuse occupant la partie inférieure de l'extracteur. La solution de savon est parcourue de bas en haut par le solvant qui s'enrichit en insaponifiable et regagne le ballon générateur, grâce à une tubulure latérale. Pratiquement, l'extraction s'effectue à température ambiante, l'agitation est faible et la dispersion de l'éther au sein du savon réduite. En contrepartie, la décantation est rapide. Cet appareillage travaille en continu et donne, au bout de huit heures, de bons résultats. Récemment, LEVY et al. (39) ont décrit un appareil à usages multiples fonctionnant sur ce principe mais dont le corps de l'extracteur est chauffé.

b) Dans l'appareil de WALBECQ (1), les vapeurs de solvant vont directement barboter dans la solution savonneuse qui, tout en se réchauffant, devient le siège d'une importante turbulence. Il y a contact intime de l'éther et de la solution hydroalcoolique, condition favorable à une bonne extraction mais ne permettant pas de soustraire le solvant du milieu puisque la complète décantation ne surviendra que plus tard, après plusieurs minutes de repos. L'auteur, utilisant un seul volume de 250 ml d'oxyde d'éthyle, réalise en moins d'une heure l'extraction de l'insaponifiable. Les résultats sont identiques à ceux que nous avons obtenus par trois extractions en ampoule.

c) Comparaison des deux appareils

A possibilités sensiblement égales, il faut remarquer que, dans le premier modèle, il y a renouvellement continu du solvant, facteur autorisant l'extraction d'un soluté présent en quantité de plus en plus faible. Avec le deu-

xième appareil, on opère à température d'ébullition du solvant, c'est-à-dire que celui-ci se trouve dans un état de dispersion tel dans la solution savonneuse que le maximum d'échanges pourra avoir lieu entre les deux phases liquides. Cependant, faute de recyclage du solvant, les conditions d'équilibre définissant les concentrations en insaponifiable de chaque phase sont vite atteintes.

Nous avons modifié l'appareil de WALBECQ comme suit : au lieu d'utiliser un volume d'éther, l'expérience est interrompue à trois reprises pour soustraire après décantation (à l'aide d'un dispositif approprié) la phase supérieure, soit environ 100 ml. Les extraits sont réunis, puis lavés. Il y a alors une meilleure récupération de l'insaponifiable et cette constatation nous a incité à repenser pratiquement le problème de l'extraction.

d) Mise au point d'un extracteur liquide-liquide à chaud

Nous avons réalisé un extracteur qui, par sa conception, réunit les avantages précédemment soulignés :

- contact étroit des deux liquides à chaud,
- élimination en continu de l'éther (impliquant une décantation préalable du mélange savon-solvant pour laquelle nous devons prévoir un compartiment exempt de perturbations).

Description - Comme le montrent les figures 1 et 2, l'appareil comprend trois parties :

1) Un ballon de 1 litre rempli aux 2/3 de solvant.

2) L'extracteur proprement dit, de forme cylindrique, surmonté d'un réfrigérant à reflux et traversé suivant son axe par une canne de verre le mettant en relation avec le ballon générateur de vapeur. Latéralement, il présente trois orifices à différents niveaux et, dans sa partie basse, un robinet de vidange R¹.

3) Le décanteur, de même diamètre que l'extracteur, en est solidaire par trois voies de communication, deux d'entre elles offrant passage au liquide en mouvement. La liaison inférieure est contrôlée par l'ouverture d'un robinet R. L'écoulement continu du solvant chargé d'insaponifiable vers l'extérieur se fait à l'aide d'un système "trop plein". Le fonctionnement de l'appareil est décrit dans la partie expérimentale et les résultats sont un peu supérieurs à ceux de la Norme, l'analyse par C.C.M. montrant une plus forte intensité des constituants peu polaires.

3. L'extraction liquide-liquide à froid : appareil de Craig

Nous disposons du modèle manuel Quickfit qui se compose principalement de :

- un bâti métallique fixe supportant un rotor actionné par manivelle et destiné à recevoir les éléments de verrerie,
- deux réservoirs à solvant de forme cylindrique,
- une batterie de 23 tubes de transfert et mélangeurs,
- deux seringues permettant d'ajuster les volumes admis (20 ml),
- des tubes de jonction.

Qu'il s'agisse de séparations analytiques ou préparatives, nous l'avons utilisé en gardant la phase inférieure (solution savonneuse) fixe, alors que la phase supérieure (éter) circule de tube en tube. Avec l'éther éthylique, nous avons obtenu un résultat inférieur à la valeur de référence et qui s'explique par suite de la volatilité de ce solvant entraînant des distorsions importantes en

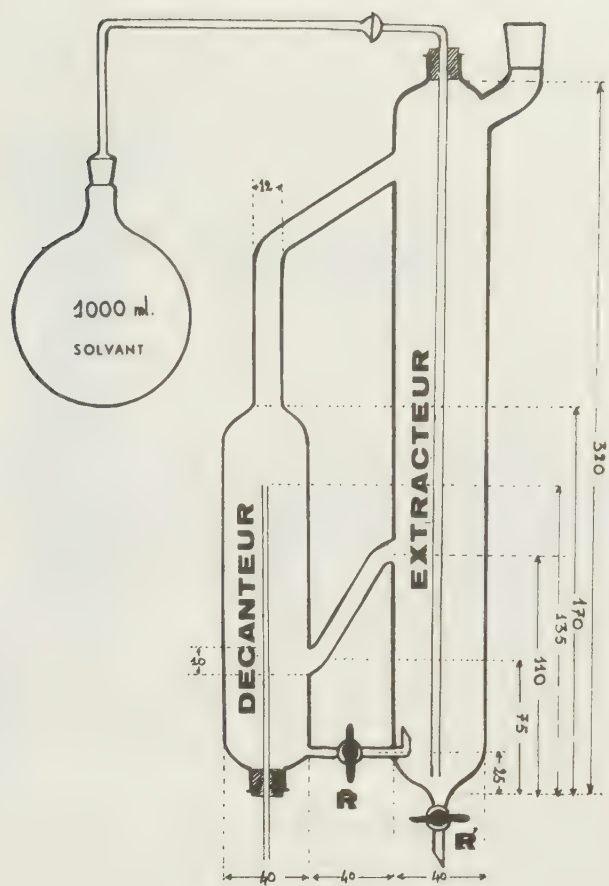


Figure 1

Extracteur liquide-liquide de
notre conception

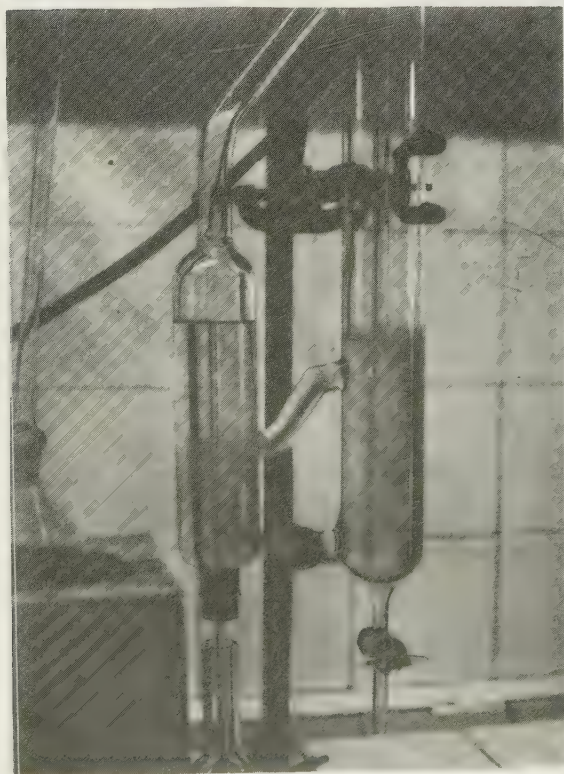


Figure 2

Extracteur en cours de fonctionnement

fin de programme. Avec l'éther de pétrole, nous obtenons un bon résultat, l'extraction étant plus complète que lorsque nous opérons à trois reprises en ampoule.

D. LAVAGE ET PURIFICATION DE L'INSAPONIFIABLE

1. Lavage

Le but du lavage est de débarrasser les extraits étherés des savons ou des traces d'acides gras qu'ils peuvent contenir. Selon la nature des solvants d'extraction utilisés, les solutions de lavage seront choisies de façon à éliminer les impuretés précitées et à affecter le moins possible la teneur et la qualité de l'insaponifiable récupéré. Nous distinguerons deux cas :

- L'insaponifiable est extrait par l'oxyde d'éthyle :

le lavage à l'eau élimine les savons mais, par hydrolyse de ceux-ci, il se forme un peu d'acides gras et il est nécessaire de prévoir un lavage par la potasse aqueuse (3 %), puis plusieurs agitations avec de nouvelles portions d'eau. Néanmoins, il subsiste des traces d'acides gras qui sont gênantes pour le fractionnement.

- L'insaponifiable est extrait par l'éther de pétrole :

les lavages par un mélange eau-alcool (1:1) entraînent la perte d'une partie des produits polaires. En utilisant une solution hydroalcoolique à 10 % (figure 3), il apparaît de nouveau une traînée provoquée par la présence d'acides gras.

Cette constatation nous semble assez intéressante. Elle permet de dire que, dans les deux cas, lors du lavage, il y a formation d'acides gras qui sont totalement éliminés par des mélanges hydroalcooliques à forte concentration en alcool mais qui subsistent dans l'insaponifiable si les extraits ne sont lavés que par de l'eau contenant 10 % d'alcool ou de l'eau pure. On obtient un insaponifiable brut et il est souvent nécessaire de le purifier.

2. Purification de l'insaponifiable : chromatographie sur couche mince de silice alcaline

Avant d'entreprendre le fractionnement de l'insaponifiable, CAPELLA et al. (34) recommandent de le débarrasser des traces d'acides gras et de savon qu'il peut contenir par passage de sa solution étherée sur colonne d'alumine. Sinon, au cours de la chromatographie sur couche de silice, les acides gras migrent avec les autres constituants de l'insaponifiable et interfèrent avec les stéroïdes ou les alcools. L'importance analytique des stéroïdes nous a incité à résoudre directement sur la couche chromatographique ce problème de purification.

La silice se prête aux modifications, la plus connue étant l'imprégnation par les sels d'argent (40). STAHL (41) décrit la préparation de couches alcalines en malaxant l'adsorbant avec une solution aqueuse de potasse. Nous avons étudié cette possibilité et déterminé que la solution 0,2 N donne les meilleurs résultats. L'examen d'une plaque normale et d'une plaque modifiée (figure 4), sur lesquelles nous avons chromatographié deux insaponifiables ainsi qu'un mélange d'acides gras, montre que sur la silice G ces derniers migrent jusqu'à la bande représentative des stéroïdes, alors que sur silice alcaline ils sont fixés au niveau de la ligne de dépôt. Le pouvoir séparateur de l'adsorbant ainsi traité n'est pas diminué et il devient possible de chromatographier directement "l'insaponifiable brut" tout en conservant les avantages qu'offrent les couches de silice.

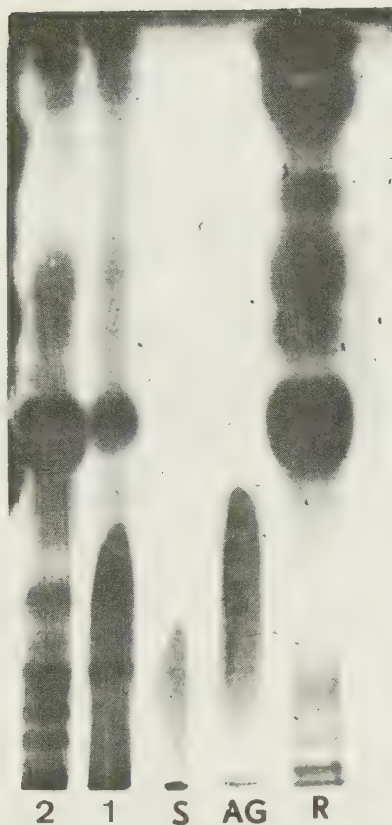


Figure 3

Etude du lavage

Réf. insaponifiable de référence

AG, acides gras

Sav. savons de potassium

1. lavage avec eau-alcool (90:10)

2. lavage avec eau-alcool (50:50)

Développement : hexane-oxyde d'éthyle (50:50)

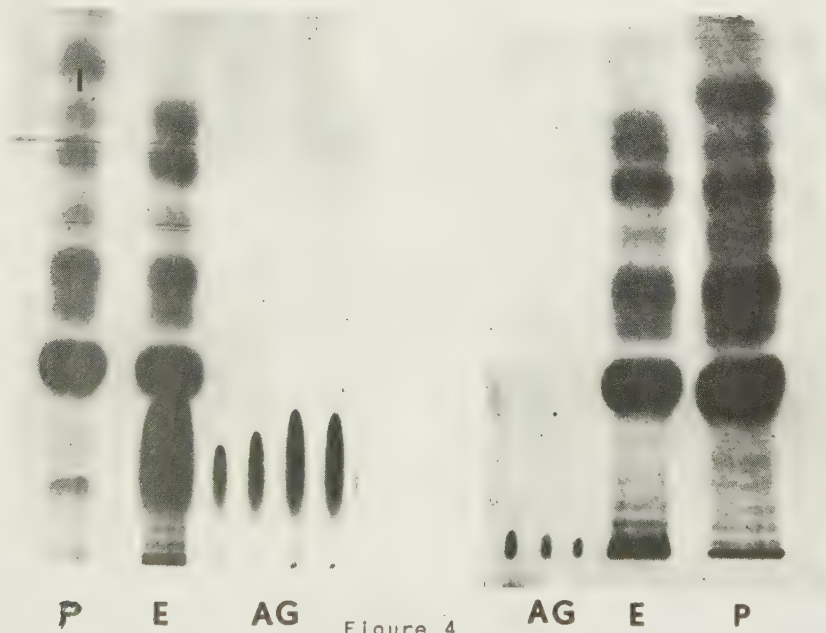


Figure 4

Chromatographie sur couches minces d'insaponifiables

Silice G pure

Silice G alcaline

P - Insaponifiable extrait par l'éther de pétrole

E - Insaponifiable extrait par l'éther éthylique

AG - Acides gras

E - METHODE D'ENRICHISSEMENT EN CONSTITUANTS MINEURS

Pour identifier une famille de constituants mineurs inconnue, il est nécessaire d'isoler 10 à 20 mg de substance pure. Une première solution pour atteindre ce but consiste à traiter plus d'huile, mais il faut multiplier en conséquence le volume de solvant, ce qui entraîne des difficultés de manipulation. Une autre possibilité consiste à "enrichir" l'huile en constituants mineurs avant la saponification et deux techniques peuvent alors être retenues :

1. La distillation moléculaire

Cette technique, dont le principe a été récemment rappelé (42), lorsqu'elle s'applique à un mélange, conduit à l'enrichissement de l'une des deux fractions obtenues par un ou plusieurs constituants. C'est une méthode précieuse pour traiter des substances fragiles qui, soumises à la distillation classique, se décomposent ou se polymérisent. HICKAMNN (43) établit le diagramme de distillation moléculaire d'une huile de foie de morue et prépare des concentrats vitaminiques. L'obtention des vitamines A, D, E des stéroïdes, des caroténoïdes, fait l'objet de nombreux brevets et publications. Dans les limites de notre sujet, nous citerons les travaux de KOZIN et al. (44), EVANS et al. (45) pour le soja, NIEWIADOMSKI (46) pour le colza, KOZIN et al. (47), HOLLO et al. (48) pour le tournesol. Ces derniers auteurs distinguent trois périodes dans la courbe d'élimination :

90°-160°C - Désacidification de l'huile	Pression :
150°-220°C - Passage de l'insaponifiable	1.10-4mm Hg
230°-250°C - Distillation des glycérides	

NIEWIADOMSKI effectue la distillation d'une huile de colza d'extraction et contrôle la teneur des fractions en insaponifiable des différentes fractions.

TABLEAU IV

Distillation moléculaire de l'huile de colza (46)

Fraction	Température	% Rendement	% Insaponifiable
légère 1	130°	2,67	3,05
" 2	150°	0,41	76,68
" 3	170°	0,36	43,36
" 4	190°	1,01	36,10
" 5	210°	3,88	0,68
lourde	130-210°	91,65	0,12

Les chiffres de ce tableau montrent qu'en opérant entre 150 et 190° on peut préparer des concentrats et débarrasser l'huile de la presque totalité de son insaponifiable.

Pour l'huile de tournesol soumise à ce traitement, nous avons obtenu une fraction légère ayant une teneur en insaponifiable correspondant à un facteur d'enrichissement de 7,6. Qualitativement, la C.C.M. révèle un enrichissement au niveau des constituants peu polaires (hydrocarbures).

2. La cristallisation fractionnée

La cristallisation des corps gras à basse température dans un solvant est une méthode de séparation intéressante puisqu'elle n'éprouve pas la matière d'oeuvre. HILDITCH (49) fractionne ainsi l'huile d'olive. On dissout généralement le corps gras dans l'acétone car, au refroidissement dans ce solvant, il se développe des cristaux de bonne structure pour la filtration. La teneur des produits non glycéridiques augmente dans la phase liquide à mesure que baisse la température et c'est un procédé de récupération des stérols à partir de la graisse de laine (50). PETROVSKII et al. (51), pratiquant la cristallisation de la graisse d'os, constatent que l'insaponifiable, représentant 0,53 % à 50°C, atteint la teneur de 5,94 % dans la fraction non cristallisée à -30°C. JACINI et al. (52) font un usage systématique de cette technique pour l'étude de toutes les substances non glycéridiques des huiles végétales. Pour l'huile d'olive, ces auteurs conseillent deux cristallisations successives, l'une à -30°C, l'autre à -70°C, dans l'acétate d'éthyle. La liqueur résiduelle de cristallisation est évaporée et le concentrat, représentant 2,9 % de l'huile, contient 17 % d'insaponifiable.

En prenant l'acétone comme solvant, nous avons préparé deux concentrats : l'un de colza à 19,8 % d'insaponifiable, l'autre de tournesol à 16,5 %. La cristallisation fractionnée, par la facilité de sa mise en oeuvre, par les quantités importantes qu'elle peut admettre, par la similitude qualitative de l'insaponifiable concentré avec le produit de référence (contrôlé par C.C.M.), est une méthode préparative très intéressante que nous avons utilisée à plusieurs reprises dans ce travail.

CHAPITRE II

FRACTIONNEMENT DE L'INSAPONIFIABLE PAR CHROMATOGRAPHIE EN PHASE LIQUIDE

-:-:-:-:-

La classification rationnelle des constituants de l'insaponifiable dressée par J.P. WOLFF et WALBECQ (53) repose principalement sur les résultats de fractionnements chromatographiques ayant l'avantage de faire apparaître des familles de composés, groupées par similitude de polarité ou analogie fonctionnelle. L'étude des mélanges complexes que sont les insaponifiables naturels a en effet largement bénéficié du développement des méthodes chromatographiques : chromatographie en phase liquide, sur colonne et surtout couche mince. Des travaux, dont nous rappellerons les plus caractéristiques ou ceux concernant les insaponifiables étudiés, ont été effectués selon l'une ou (et) l'autre des deux techniques. Il nous a semblé intéressant de faire ressortir les possibilités complémentaires de chacune, compte tenu des paramètres sur lesquels nous pouvons jouer (adsorbants, éluants, modes de développement) et du but à atteindre, c'est-à-dire isoler en quantité appréciable des fractions d'une pureté satisfaisante.

I. TRAVAUX ANTERIEURS

A. Sur colonne

L'une des premières tentatives de fractionnement chromatographique de l'insaponifiable de soja est décrite par CRUZ AUNON (54) qui utilise une colonne d'alumine et recueille trois fractions qu'il caractérise par des indices. Une méthode d'application générale est proposée par CAPELLA et al. (34). Ces auteurs choisissent l'acide silicique comme adsorbant et opèrent d'abord sur mélanges synthétiques pour mettre au point le schéma d'élution. Les solvants sont utilisés seuls ou en mélange, leur nature et leur volume étant en relation avec la polarité des constituants à éluer et les quantités supposées présentes. La transposition devient possible pour l'étude d'un insaponifiable inconnu. Cependant, il n'est pas fait mention des tocophérols et les alcools aliphatiques sont élués avant les alcools terpéniques, résultat en contradiction avec ce que nous avons pu observer aussi bien sur colonne que sur couche mince.

HOFFMANN et al. (16) analysent, sur colonne de silice imprégnée de benzène méthanolique à 16 %, l'insaponifiable d'une huile de soja, l'éluant étant un mélange de benzène à 2 % de méthanol. Un autre adsorbant, le florisil (silicate de magnésium synthétique) a été utilisé par EISNER et FIRESTONE (55) pour fractionner plusieurs insaponifiables dont celui de soja. Le florisil offre une sélectivité comparable à celle de la silice sans en présenter les inconvénients (lenteur de l'élution). Néanmoins, même avec cet adsorbant, les récents travaux de NAUDET et al. (56) montrent qu'il est difficile d'obtenir des fractions pures, comme nous l'avons constaté nous-mêmes.

Quel que soit l'adsorbant, la chromatographie sur colonne constitue une intéressante méthode préparative, à condition d'opérer sur des prises d'essais importantes (de l'ordre du gramme). Par exemple, par chromatographie sur alumine, le cycloarténoï a été isolé à partir de l'huile de lin (57), les alcools et stéroïdes de plusieurs insaponifiables ont été déterminés (58) (59). C'est aussi dans ce sens que se sont orientés nos travaux dans lesquels nous avons retenu deux adsorbants : l'alumine et la silice.

B. Sur couche mince

1. Aspect qualitatif

La chromatographie sur couche mince de gel de silice G est introduite dans l'étude des mélanges lipidiques par MANGOLD et MALINS (60) qui fractionnent quelques insaponifiables avec le mélange hexane-oxyde d'éthyle-acide acétique (70:30:1 ou 2). HOFFMANN et al. (16) identifient des constituants mineurs peu polaires de l'huile de soja après élution par un mélange pentane-oxyde d'éthyle (90:10). CAPELLA et al. (61) en 1963 étudient les alcools terpéniques et les stéroïdes de plusieurs insaponifiables dont ceux provenant d'huiles de soja, colza et tournesol. Ces auteurs recommandent des couches de silice G ou d'alumine basique et remarquent que, dans ce dernier cas, il est pas nécessaire de débarrasser l'insaponifiable des traces d'acides gras qui restent alors au niveau de la ligne de dépôt. Le développement est réalisé par le mélange hexane-oxyde d'éthyle (50:50). WALBECQ (1) fractionne l'insaponifiable d'une huile d'arachide sur alumine G avec le système pentane-oxyde d'éthyle (80:20). KARLESKIND (62) expérimente plusieurs adsorbants et mélanges éluants afin de séparer convenablement alcools aliphatiques, alcools terpéniques et stéroïdes. Il n'obtient de résultats satisfaisants qu'en chromatographiant les insaponifiables sur des plaques de grandes dimensions (20 x 40 cm) avec un développement horizontal en cuve étroite de sa confection. Les possibilités de cette variante opératoire avaient été exploitées auparavant par JURRIENS (63) pour le fractionnement de glycérides. En développant verticalement de telles plaques, AVIGNAN (64) analysait des acétates de stéroïdes et FREEMAN et al. (65) des mélanges lipidiques. Le développement multiple est pratiqué par SCHMIDT (66) pour concentrer des constituants mineurs. Nous utiliserons par la suite les résultats de recherches d'un caractère général sur la séparation des mélanges concernant l'influence de la saturation des cuves (67), l'utilisation des cuves de volume réduit (68) et les techniques de développement (69) mis en application ici.

2. Aspect quantitatif

A la suite de la C.C.M. préparative, une ou plusieurs fractions pourront être dosées après récupération. Les principaux travaux orientés dans ce sens sont ceux de PRIVETT et al. (70), de KUKSIS (71) et de SKIPSKI et al. (72). Une autre méthode consiste à faire le dosage sur la plaque elle-même après carbonisation des substances : c'est la densitométrie.

PEIFER (73) est le premier à faire usage de la densitométrie pour évaluer le cholestérol présent dans des extraits lipidiques. BLANK et al. (74) en décrivent les possibilités pour l'analyse quantitative des lipides. Récemment, FEDELI et al. (75) ont dosé ainsi quelques constituants des insaponifiables.

PRIVETT et al. (76) font remarquer que l'intensité des taches varie selon l'insaturation des composés et que, d'autre part, la température de carbonisation doit être choisie de façon à assurer dans chaque cas une oxydation suffisante pour une évaporation réduite. Une température ne dépassant pas 200°C serait

convenable et il paraît souhaitable de ne pas utiliser un oxydant trop puissant car, comme le précise GENT (77); la réaction se poursuit jusqu'à la formation de gaz carbonique. Des formules de réactifs de pulvérisation ont été proposées : acide phosphorique à 50 %, acide sulfurique à 50 %, acide sulfurique-permanganate de potassium (78), mais les résultats les plus reproductibles sont obtenus par le mélange sulfochromique adopté avec des variantes de concentration par BLANCK et al. (74), KAUFMANN et al. (79), NAUDET et al. (80). Cet auteur signale que la densitométrie est surtout applicable aux bandes situées à mi-distance entre le point de départ et le front du solvant.

Nous avons étudié systématiquement les conditions de développement des chromatogrammes avant d'identifier les différentes taches obtenues. L'analyse quantitative a été entreprise pour les constituants pondéralement les plus importants, soit après grattage et extraction des bandes par gravimétrie et colorimétrie, soit sur la plaque chromatographique par densitométrie. Enfin, une application de la chromatographie en couche demi-mince (0,5 mm) préparative est donnée pour l'isolement rapide des mélanges stéroliques.

II. PARTIE EXPERIMENTALE

A. CHROMATOGRAPHIE SUR COLONNE

1. Chromatographie d'insaponifiables synthétiques et naturels sur colonne d'alumine

Une alumine neutre, de granulométrie 18-23 (AFNOR), activée, est hydratée soit en milieu solvant (81), soit comme nous l'avons expérimenté par soufflage d'air humide. L'activité est contrôlée par la méthode de HESSE (82) qui mesure colorimétriquement par différence la quantité d'azobenzène fixé sur l'adsorbant. L'alumine hydratée à 10 % et d'indice d'azobenzène 12 nous a permis de séparer convenablement un mélange témoin de cholestérol et d'alcool oléylique (1:1). Cette qualité est conservée par la suite. Le schéma d'élution (figure 5) a été mis au point sur un mélange synthétique. La récupération des hydrocarbures est satisfaisante, celle des autres constituants moins bonne mais reste acceptable. Sur insaponifiable naturel (colza), la complexité du mélange se traduit par un grand nombre de pics dont rend compte le deuxième graphique. L'analyse des fractions sur couche mince confirme que la plupart d'entre elles sont des mélanges. Néanmoins, le schéma d'élution proposé permet d'isoler facilement quatre fractions.

- les hydrocarbures et carotènes hydrocarbures,
- des constituants de polarité intermédiaire : tocophérols,
- les alcools,
- les stérols.

2. Chromatographie d'insaponifiables naturels sur colonne de silice

Les insaponifiables de colza, puis de tournesol, sont dissous dans l'hexane une fois débarrassés des traces d'acides gras qu'ils peuvent renfermer par passage préalable sur colonne d'alumine à 20 % d'eau. La solution est appliquée à une colonne d'acide silicique de 100 mesh de granulométrie. Au lieu d'éluer par une succession de mélanges en volumes définis, un seul mélange de faible polarité (hexane-oxyde d'éthyle 95:5) est conservé pendant toute la chromatographie et l'analyse des fractions par C.C.M. (figure 6) montre qu'il y a une progression lente et continue dans la desorption et dans l'entraînement des différentes classes de constituants. Cette méthode a été utilisée pour isoler les alcools triterpéniques de lin, puis les méthylstérols de colza.

3. Chromatographie préparative des stérols sur colonne d'alumine

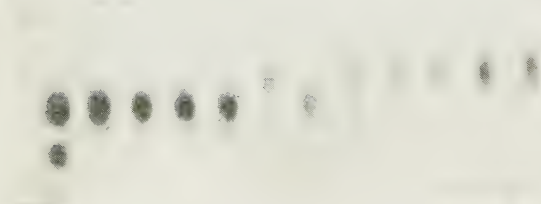
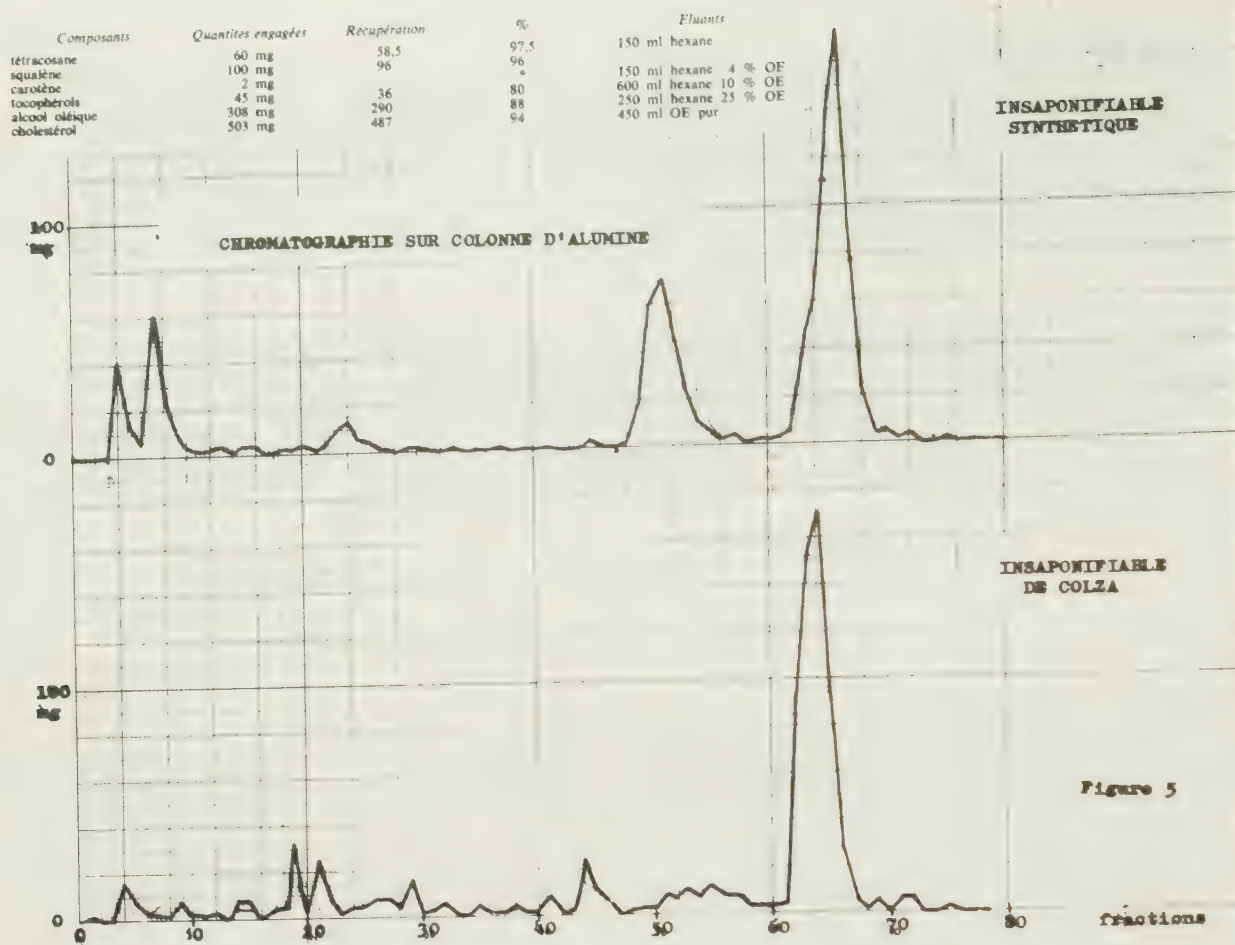


Figure 6

Chromatographie d'insaponifiable
sur colonne d'acide silicique
Contrôle des fractions par C.C.M.

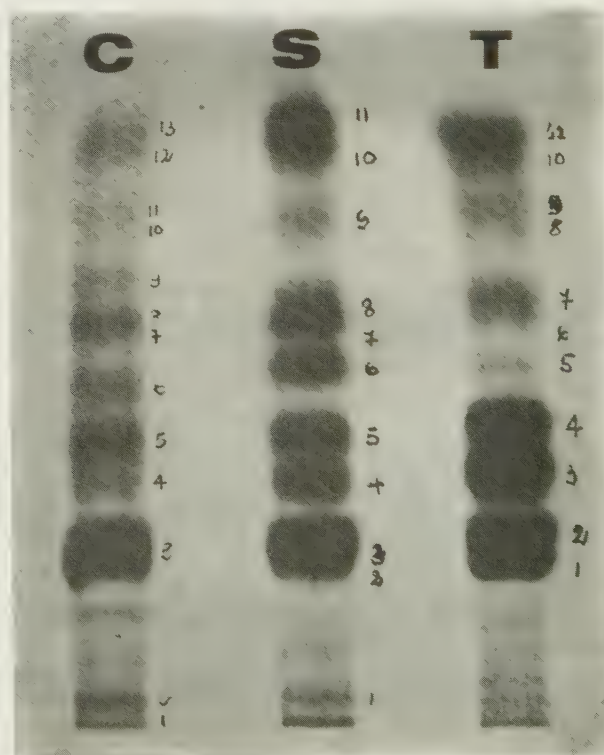


Figure 7

Chromatographie sur couche de silice C
des insaponifiables de colza (C),
soja (S) et tournesol (T)

Développement : hexane-oxyde d'éthyle
(1:1)

Les deux méthodes expérimentées ne présentent d'intérêt préparatif que pour obtenir des quantités relativement faibles de certains constituants. C'est pourquoi nous avons recherché une technique de préparation directe des stéroïls.

Les esters méthyliques d'une huile renfermant des substances insaponifiables, les plus polaires d'entre elles (par exemple, les stéroïls) peuvent être fixées sur alumine peu active (15 % d'eau) et seront entraînées par lavage de la colonne à l'éther pur. Nous avons ainsi isolé quelques grammes de stéroïls de colza et de tournesol qui ont été ensuite recristallisés dans le méthanol. Ces stéroïls ainsi préparés ont la même composition qualitative que les stéroïls isolés à partir de l'insaponifiable.

B. CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE

Les couches de silice G de 250 μ d'épaisseur sont préparées selon la technique classique de STAHL (69).

1. Etude du développement

Dans ce type de chromatographie, le développement du chromatogramme est plus complexe que sur colonne car des échanges se produisent à tous les niveaux de la couche dès que celle-ci est introduite dans la cuve. Les portions d'adsorbant non encore imprégnées d'éluant subissent une succession d'équilibres avec la vapeur de solvant dont la composition en un point donné de la plaque se modifie graduellement au cours du développement. Les variations du pouvoir adsorbant qui en résultent peuvent grandement favoriser certaines séparations. Il sera donc intéressant d'intervenir :

- sur le système chromatographique lui-même : saturation ou non saturation de la cuve, réduction de son volume, utilisation de plaques de grandes dimensions (20 x 40) ;
- sur la technique de développement : normal, à front perdu, à deux dimensions, multiple.

a) Etude du développement avec différents types de cuve

Cuve saturée - Trois des parois verticales de la cuve sont tapissées de papier filtre et, après avoir versé le mélange de développement, la cuve est abandonnée une heure avant utilisation. La migration simple est réalisée avec le système hexane-oxyde d'éthyle (50:50) ou hexane-acétate d'éthyle (80:20) et pour les trois insaponifiables déposés on obtient après révélation des séries de bandes plus ou moins bien séparées (figure 7) (Tableau V).

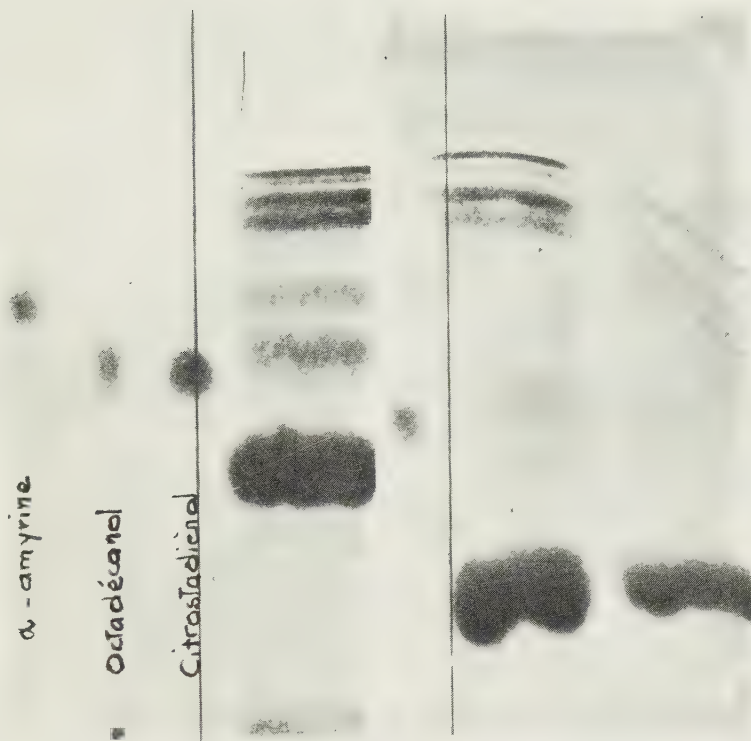
Cuve non saturée - Lorsque le système éluant contient un solvant très volatil (éther) dans les conditions normales de développement (cuve saturée), la vapeur de ce solvant s'adsorbe au niveau de la partie sèche de la couche et diminue son pouvoir séparateur. En l'absence de cette présaturation de la cuve, nous constatons (Tableau V) que la plupart des R_f changent et que les bandes représentatives des constituants peu polaires sont plus étroites et mieux résolues.

Chambre de volume réduit - La réduction du volume de la chambre de développement telle qu'on peut l'obtenir en réalisant un "dispositif sandwich" (vertical ou horizontal) modifie la position et la géométrie des bandes (figure 8). Ceci s'explique car au cours du développement par un mélange binaire, dans ces conditions, il apparaît nettement deux fronts, le premier correspondant au solvant le moins adsorbé et le second au mélange (figure 9). L'examen de la plaque nous montre qu'il y a séparation entre alcools aliphatiques et alcools triterpéniques. Les constituants les moins polaires apparaissent sous forme de bandes très étroites et distinctes.

TABLEAU V
Etude de la variation des R_f selon le mode de développement
(insaponifiable de l'huile de colza)

B a n d e s	Solvant : hexane-oxyde d'éthyle (1:1)				Solvant hexane-acétate d'éthyle (80:20)			
	Cuve saturée	Cuve non saturée	Double développement	Front perdu	Cuve saturée	"Cuve sandwich"	Cuve horizontale plaque 20 x 40	Cuve saturée plaque 20 x 40 verticale
1 acides triterpéniques ?	0,01	0,02	0,04	0,04	0,01	0,01	0,01	0,01
2 caroténoïdes hydroxylés	0,04	0,04	0,05	0,08	0,02	0,03	2-0,03; 2	2-0,02; 2'-0,03
3 stérols	0,28	0,32	0,40	0,44	0,23	0,44	0,40	0,24
4 alcools aliphatiques - méthyls stérols	0,38	0,44	0,52	0,58	0,36	0,54	0,56	0,35
5 alcools terpéniques	0,45	0,51	0,60	0,68	0,41 (5)	0,62 (3)	0,62	0,39
6 ?	0,52	0,58	0,66	0,78	0,46	0,66	0,67	0,43
7 ?	0,60	0,63	0,74	0,90	0,54	0,68	0,71	0,52
8 α + γ tocophérols	0,65	0,69	0,77		0,59	0,68	0,72	0,57
9 cétones terpéniques	0,73	0,78	0,80		0,68 (5)	0,70 (1,5)	0,73	0,60
10 carotènes	0,87	0,83	0,87		0,75	0,72	0,75	0,67
11 polymères de tocophérols	0,90	0,91	0,90		0,81	0,73	0,76	0,74
12 squalène	0,94	0,93	0,93		0,90 (8)	0,73 (1)	0,77	0,76
13 hydrocarbures paraffiniques	0,97	0,97	0,97		0,96	0,74	0,78 front : 350 mm	0,81 front : 370 mm

() largeur des bandes en mm



8a. Plaque de 20x20

8b. Plaque de 20x40

Figure 8

Chromatographie de l'insaponifiable de colza : développement en chambre de volume réduit (hexane-acétate d'éthyle (80:20))

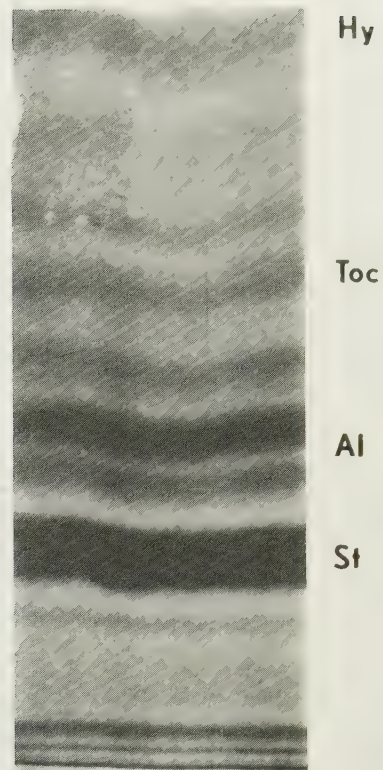
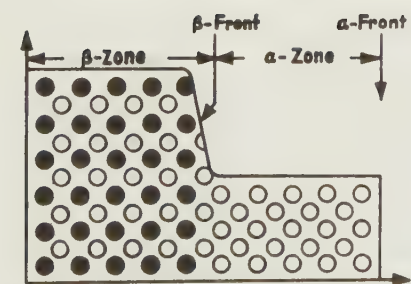
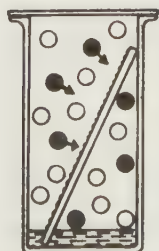


Figure 10

Plaque de 20 X 40
Chromatographie d'insaponifiable de colza. Développement en cuve saturée (hexane-acétate d'éthyle (80:20))



Chambre de développement à volume réduit (BN)



chambre de développement à volume classique atm. saturée.

Figure 9

Développement en cuves de volume normal et de volume réduit (mélange solvant binaire)

Cuve de grandes dimensions - Elle admet des plaques de 20 x 40 cm. Bien que les Rf soient comparables, la résolution des bandes est améliorée en particulier pour les constituants polaires. Cette résolution est la résultante de deux phénomènes antagonistes : d'une part, l'augmentation de la distance de migration favorise la séparation de deux bandes voisines mais, d'autre part, la vitesse de cette migration en fin de développement devient si faible qu'il y a diffusion des solutés et élargissement des bandes. (Figure 10).

b) Différentes techniques de développement en cuve saturée

Développement à front perdu - La plaque séjourne deux ou trois fois plus longtemps dans la cuve que le complet développement ne le nécessite. Nous avons imaginé un dispositif facilitant le cheminement du solvant en prolongeant la plaque par une feuille de papier filtre recourbée vers le bas de la cuve. Les Rf sont analogues à ceux que l'on observe avec les plaques verticales de grande dimension.

Le développement multiple - Après une première migration, la plaque est retirée de la cuve puis portée quelques minutes à 70°C. Une fois sèche, on la plonge de nouveau dans la cuve et l'opération peut être répétée plusieurs fois avec le même mélange de solvants ou un nouveau système. De la sorte, nous avons pu obtenir, dans le cas de l'insaponifiable de tournesol, un dédoublement de la fraction stérolique (cf. "les stérols", page 50). De même, il a été possible de séparer à la suite de 4 migrations les alcools aliphatiques des méthylstérols de tournesol (cf. "les méthylstérols", page 56).

Développement avec gradient de concentration - La plaque est placée dans une cuve contenant un solvant ou un mélange de faible polarité. A l'aide d'un dispositif approprié, il est possible d'introduire dans la cuve, régulièrement et durant tout le développement, un solvant polaire de façon à obtenir une augmentation progressive de polarité de l'éluant. La résolution des fractions peu polaires est améliorée.

En conclusion de ces essais, nous pouvons dire que le développement dans les conditions habituelles donne déjà des résultats satisfaisants. La non saturation de la cuve ou le développement à gradient d'élution améliore la résolution au niveau des constituants de faible polarité, l'utilisation de cuves sandwich permet de séparer alcools aliphatiques et terpéniques, l'augmentation de la distance de migration (grande plaque, front perdu) facilite la séparation des constituants les plus polaires, alors que le développement multiple entraîne le dédoublement de bandes représentatives de certains constituants (stérols).

II. Analyse qualitative

I. Révélation des bandes

La plaque une fois développée est retirée de la cuve, puis séchée. A part les caroténoïdes, les autres constituants de l'insaponifiable sont peu ou ne sont pas colorés. Certains (alcools diterpéniques, phytoènes) présentent une fluorescence à l'irradiation par la lumière ultraviolette et peuvent de cette façon être détectés. La plupart d'entre eux sont révélés au moyen d'un réactif que l'on pulvérise sur la couche chromatographique. Le résultat de cette opération pourra déjà être visible à froid (fixation d'iode sur les doubles liaisons) ou nécessitera le chauffage de la plaque s'accompagnant de l'apparition de taches colorées avec, en contrepartie, transformation et même dégradation (carbonisation) des constituants, irrécupérables pour une analyse ultérieure.

Les réactifs que nous avons utilisés sont non spécifiques (acides sulfurique, phosphomolybdique ; iode) ou spécifiques pour une classe de constituants (complexe rose Fett - ~~ma~~ dipyrldyle pour les réducteurs et particulièrement les tocophérols). Pratiquement, pour un lot de chromatogrammes identiques, le premier a été pulvérisé avec l'acide sulfurique demi-concentré alors que les autres ont été traités par divers réactifs qui sont mentionnés dans le Tableau VI si leur action est caractéristique.

TABLEAU VI

Identification des constituants de l'insaponifiable

INSAPONIFIABLE						REVELATIONS		IDENTIFICATION
COLZA		SOJA		TOURNESOL		H ₂ SO ₄ conc.	Autres	
Bande	Rf	Bande	Rf	Bande	Rf			
13	0,97	11	0,97	11	0,97	gris noir lentement		hydrocarbures paraffiniques
12	0,94	10	0,93	10	0,93	violet	fixation 12	hydrocarbures polyéniques (squalène)
11	0,90	9	0,89	9	0,89	marron	Emmerie-Engel positive bleue avec phosphomolybdate à froid	polymères de tocophérols
10	0,87	9	0,87	9	0,87	marron	naturellement colorée en jaune- orangé	caroténoïdes
9	0,72					orangé vif	D.N.P.H. positive à froid brun avec SbCl ₃	cétones triterpéniques
8	0,65	8	0,65	7	0,68	vert	Emmerie-Engel positive bleue avec phosphomolybdate à froid	α et γ tocophérols
7	0,60	7	0,59	6	0,60		rouge-bleu avec SbCl ₅ fluorescence UV partielle	plastochromanol ?
		6	0,55				Emmerie-Engel positive	δ -tocophérol
6	0,52			5	0,53	marron		?
5	0,45	5	0,45	4	0,45	marron	jaune-rouge avec SbCl ₅	alcools terpéniques
4	0,33	4	0,38	3	0,38	marron		alcools aliphatiques méthylstéroïls
3	0,28	3	0,28	2	0,28	violet	pourpre avec SbCl ₃	stéroïls
		2	0,24	1	0,24	bleu	jaune avec SbCl ₃	Δ^7 -sténols
2	0,04	1	0,03			bleu puis brun	naturellement jaune	caroténoïdes hydroxylés
1	0,01					rouge ou rose	violette avec aldéhyde anisique	acides triterpéniques ?

2. Identification des bandes

Sur la plaque elle-même - Nous avons comparé la migration d'étalons avec celle des constituants des trois insaponifiables (figure 11). Pour chaque réactif pulvérisé, nous avons noté la coloration et même parfois la vitesse de développement de la coloration. Par exemple, les alcools aliphatiques saturés et les méthylstérois ont des R_f très semblables, mais la révélation sulfurique donne une tache marron-violet avec les méthylstérois qui apparaît en 5 minutes à 110°C, alors que les alcools aliphatiques se signalent au bout de 20 minutes dans les mêmes conditions par une tache jaune virant au marron puis au noir. Notre gamme d'étalonnage comprenait : acide oléique, β -sitostérol, alcool stéarylique, citrostadiénol, α amyrine, α tocophérol, β carotène, squalène, tétra-cosane.

Hors de la plaque après grattage et élution - la plaque préparative est révélée par un réactif non destructeur (dichlorofluoresceine, rhodamine 6 G) et les bandes délimitées sous lumière U.V. sont détachées puis extraites par un solvant convenable. Des essais de caractérisation fonctionnelle sont effectués sur les extraits : réactions chimiques, spectres I.R. (cf. "cétones terpéniques, page 46).

III. Analyse quantitative

Si sur la chromatoplaque la résolution entre deux taches est complète, il est alors possible d'entreprendre une détermination quantitative. Pour ce faire, deux types de méthodes pourront être appliqués :

- La bande ou la tache concernée est repérée, l'adsorbant après grattage est extrait et la substance recueillie est dosée par une technique appropriée, hors de la plaque. L'obtention de résultats précis nécessitera des dépôts plus importants et la chromatographie deviendra préparative.

- La mesure est faite in situ avec ou sans transformation préalable de la substance, mais en ayant toujours recours à un étalonnage.

Nous avons expérimenté ces deux possibilités, choisissant comme méthode de dosage, dans le premier cas, la gravimétrie et la colorimétrie ; dans le second, la densitométrie.

1. Gravimétrie

La gravimétrie présente l'avantage de rendre exactement compte des masses de substance réellement présentes et, malgré la simplicité de sa mise en oeuvre, elle nécessite pour être rigoureuse de prendre plusieurs précautions :

- Débarrasser complètement la plaque des polluants qu'elle peut contenir - La silice renferme toujours des impuretés organiques (70) que nous avons éliminées par un lavage préalable à l'éther éthylique, ce qui présente cependant l'inconvénient de rendre la couche plus fragile

Déposer des quantités suffisantes - Les plaques de silice G de 0,25 mm n'admettent pas plus de 25 mg de dépôt en bande continue, quantité insuffisante lorsqu'il s'agit d'évaluer la teneur de constituants pondéralement peu importants. Nous avons utilisé des plaques de 0,5 mm de silice PF₂₅₄ (adsorbant spécialement conçu pour les séparations préparatives) sur lesquelles nous déposons jusqu'à 100 mg.

Délimiter correctement les bandes représentatives des constituants par pulvérisation de réactifs de détection à la fois sensibles et non destructifs. Nous avons utilisé la dichlorofluoresceine en solution alcoolique et la rhodamine 6 G en solution aqueuse, ce dernier colorant étant insoluble dans l'éther éthylique. Les plaques sont examinées sous lumière ultraviolette. La fluorescence naturelle de certaines bandes (alcools diterpéniques) facilite parfois la délimitation.

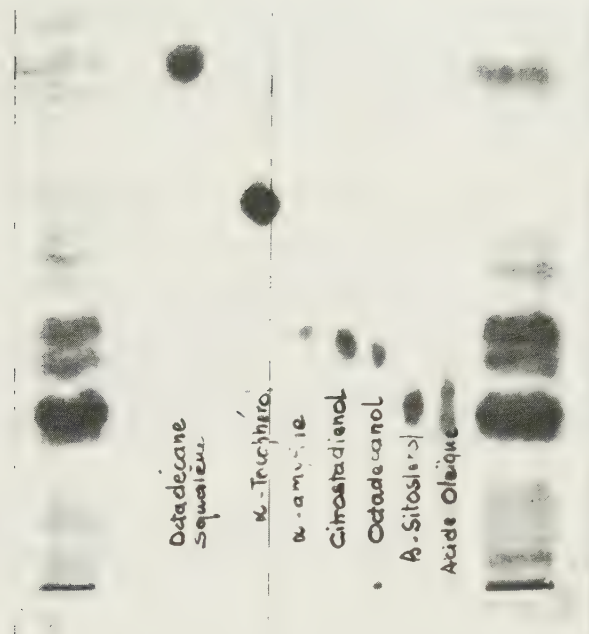
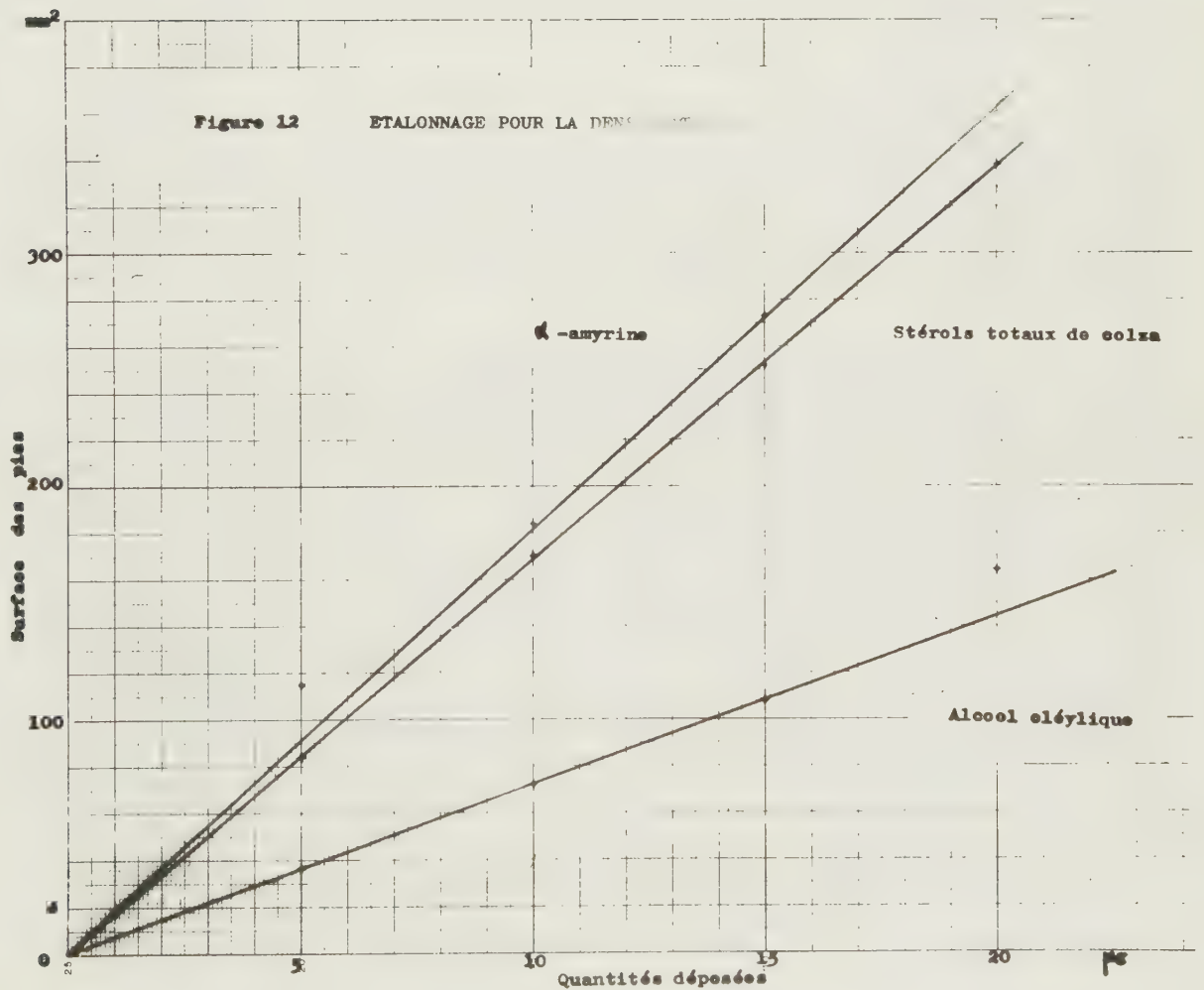


Figure 11

Identification des constituants de l'insaponifiable
à l'aide d'étalons



- Désorber complètement les substances fixées - Sur la poudre récupérée par grattage de la plaque, nous avons comparé trois méthodes d'extraction : le microsoxhlet, la microcolonne et l'extraction dans un solvant à ébullition suivie de filtration. Nous avons retenu les deux dernières, à la fois rapides et de bonne répétabilité. L'utilisation du microsoxhlet se justifierait seulement pour une complète récupération des alcools gras.

Les tableaux VII et VIII rassemblent les résultats de nos essais.

2. Densitométrie

La plaque chromatographique carbonisée à l'aide de réactifs appropriés, montre un ensemble de taches. La forme et l'intensité des taches sont en relation avec les quantités de substances déposées que l'on pourra évaluer par comparaison avec une gamme d'étalons. La densitométrie, en mesurant photométriquement l'adsorption de la lumière à travers la couche translucide et les taches, permet d'établir cette comparaison.

Nous avons appliqué cette technique au dosage des stérols dans l'insaponifiable de colza. Ces constituants forment une bande située dans la partie médiane de la plaque.

Malgré la rapidité d'exécution et la sensibilité de la méthode, pratiquement plusieurs précautions doivent être prises pour obtenir des résultats corrects et parvenir à une bonne répétabilité.

- La carbonisation, c'est-à-dire la transformation de la matière organique en carbone élémentaire, doit être aussi complète que possible. On opère à chaud en présence d'un réactif oxydant et le rendement de la réaction dépend à la fois des propriétés de la substance que l'on oxyde, des réactifs utilisés, des conditions opératoires.

- D'autres facteurs, comme la régularité d'épaisseur des plaques, l'homogénéité de l'aérosol, du réactif, la durée de pulvérisation, la température de l'étuve, sa régulation thermique et le temps pendant lequel la plaque y séjourne, devront être définis et contrôlés. Les difficultés que nous avons rencontrées pour pulvériser correctement et d'une façon toujours identique font que nous avons adopté la solution proposée par JONES et al. (83) qui consiste à plonger la plaque dans une cuve saturée de chlorure de sulfuryle, puis à l'exposer à la vapeur d'eau avant de la placer dans l'étuve. Nous avons ainsi obtenu des résultats satisfaisants.

- La mesure densitométrique. Les taches une fois minéralisées absorbent la lumière et, si la plaque est explorée à vitesse constante par un mince pinceau lumineux, il est possible d'enregistrer les variations d'absorption lors du déplacement. Celles-ci se traduisent pour une tache régulière par un pic dont la surface est proportionnelle à la quantité de substance déposée. Le photodensitomètre à chaque instant ne doit mesurer que la lumière qui passe à travers la tache, d'où l'intérêt, comme le préconise RONDELET (84), de faire des dépôts sous forme de bandes dont la longueur devra être inférieure à celle de la fente lumineuse. La largeur de fente sera la plus faible possible. La densité optique ne doit pas être supérieure à 0,7 pour la tache la plus intense. La réponse différente de chaque constituant oblige à réaliser dans chaque cas une échelle d'étalonnage, ce qui semble la solution la plus sûre malgré une récente tentative de DOWNING (85) pour obtenir une analyse complète d'un mélange par un seul enregistrement et sur une seule plaque par carbonisation à température programmée. La figure 12 représente les droites d'étalonnage construites après densitométrie de quantités croissantes et connues de stérols de colza, d' α -amyrine et d'alcool oleylique, dans le cas de carbonisation avec du chlorure de sulfuryle. Dans les deux premiers cas, les pentes observées sont très semblables (analogie de constitution chimique), mais elles diffèrent de celle de l'alcool oleylique. La teneur en stérols de l'insaponifiable de colza, déterminée par cette méthode (510 mg/100 g), est comparable à la valeur que donne la gravimétrie.

TABLEAU VII

Etude de la desorption après chromatographié
sur plaque

Substances	Mode de desorption	Déposé (mg)	Récupéré (mg)
<u>Stérols de colza</u>	Microsoxhlet 1 heure	10 5 2	9,8 4,7 1,8
	Solvant à ébullition 10 minutes	10 5	9,8 4,8
	Microcolonne	10 5 2,5 1	9,7 4,7 2,2 0,8
<u>Insaponifiable synthétique</u> tétracosane squalène α tocophérol α amyryne docosanol stérols de colza	Microcolonne	3 5 8 10) 14) 60	2,6 4,9 8 20,8 57,6

TABLEAU VIII

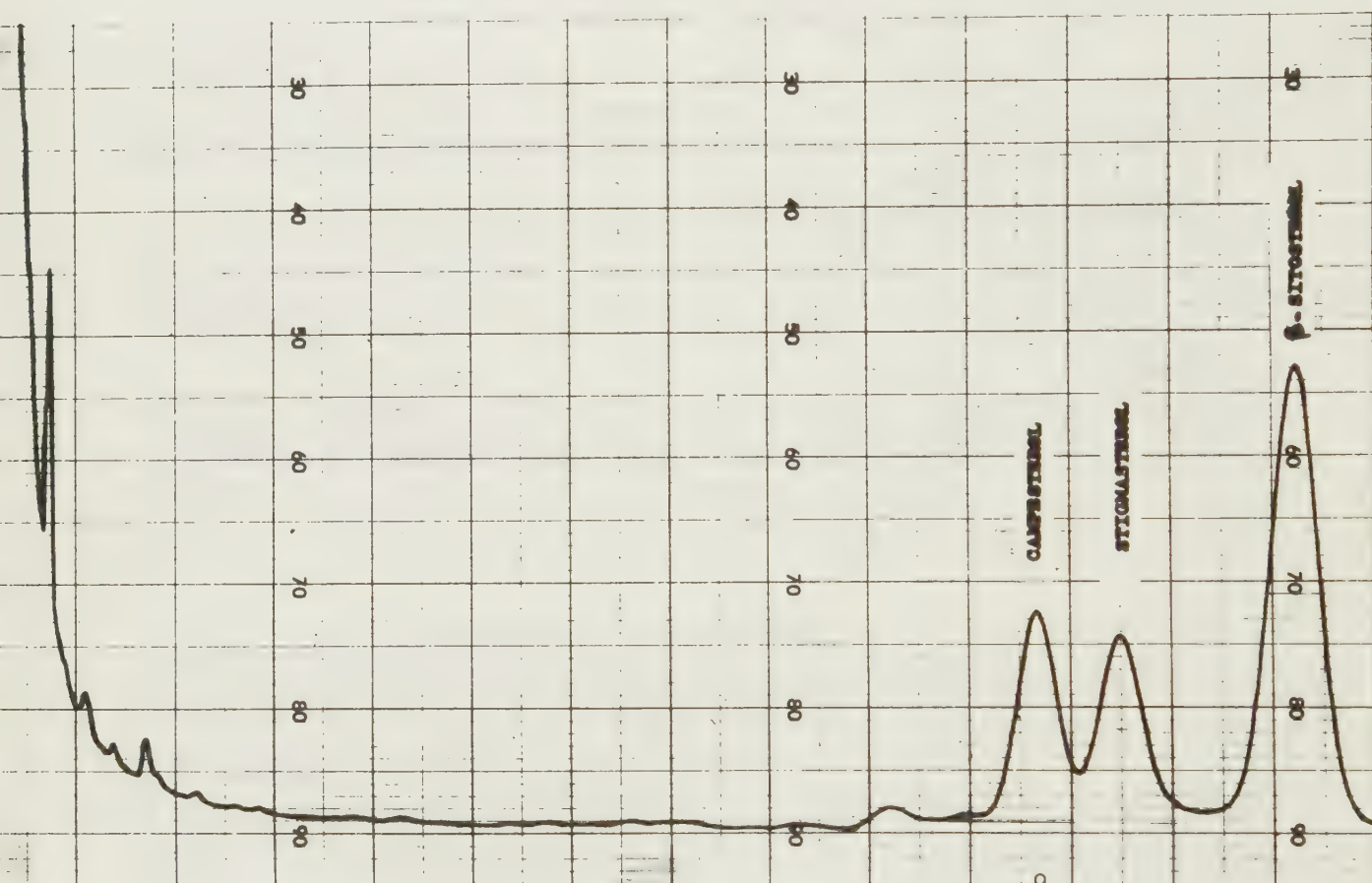
Gravimétrie des principaux constituants de l'insaponifiable
mg/100 g huile

Constituants	Colza	Soja	Tournesol
Stérols	540	375	325
Alcools aliphatiques + méthylstérols	50	20	100
Alcools triterpéniques	45	120	165
Hydrocarbures totaux	36	28	23

IV. Chromatographie préparative sur couche de silice G :
préparation des stérols sans isolement préalable de l'insaponifiable

- Le fractionnement chromatographique sur plaque de l'insaponifiable offre d'abord un intérêt analytique et, si les fractions séparées sont d'une pureté satisfaisante, la chromatographie peut devenir préparative pour un ou plusieurs groupes de constituants. L'insaponifiable est alors mis en solution chloroformique puis déposé, non plus en spots, mais en bandes (en quantité compatible avec les limites de capacité de la couche). C'est une technique désormais classique, que nous utiliserons du reste ici.

- Mais, si l'on effectue la transestérification de l'huile par le méthanol, on peut considérer que l'insaponifiable est en solution dans les esters méthylliques. Des constituants comme les stérols, présents à des concentrations comprises entre 0,3 et 0,6 % et d'une polarité assez différente des esters, pourront être récupérés en quantités suffisantes pour effectuer par exemple une chromatographie en phase gazeuse (figure 13). Pour ce faire, les esters méthylliques (0,5 ml) sont directement déposés sur couche de silice G de 0,5 mm d'épaisseur. Les stérols, après délimitation de leur bande représentative, sont extraits, puis chromatographiés. Nous avons vérifié, dans le cas du soja, que leur composition est identique à celle des stérols préparés à partir de l'insaponifiable.



STEROLS SOJA
T.M.S.

Récupération sur plaque silice G après dépôt
500 μ l d'esters méthylliques

Figure 13

Chromatographie en phase gazeuse des stérols de soja
récupérés par C.C.M. préparative des esters méthylliques

CHAPITRE III

ETUDE DES CONSTITUANTS DE L'INSAPONIFIABLE

Beaucoup de constituants des insaponifiables sont de structure terpénique et leur formation a été expliquée à la suite de très nombreux travaux que WALLER a résumés récemment dans une étude bibliographique sur le métabolisme des terpénoïdes végétaux (86). En nous inspirant d'un schéma général publié par GOODWIN (87) et à l'aide des conclusions de OURISSON et al. (88) (89) sur la biosynthèse des phytostérols, nous avons dressé le tableau IX dans lequel apparaissent la plupart des constituants signalés jusqu'alors et des intermédiaires, comme par exemple les méthylstérols dont nous avons démontré la présence dans quelques huiles végétales.

Les alcools correspondant aux premiers termes de la biosynthèse se rencontrent rarement car, dans les conditions habituelles, de préparation de l'insaponifiable, par suite de leur volatilité, ils sont perdus pour l'analyse. Les homologues sesqui et diterpéniques n'ont été déterminés que qualitativement (62). CAPELLA et al. (90) ont identifié dans l'huile de lin le geranylgeraniol et le phytol, cet alcool étant présent dans la plupart des insaponifiables.

L'examen de ce schéma montre que le farnesylpyrophosphate, par duplication, conduit au squalène, précurseur des stérols. Par une réaction de même type, le geranylgeranylpyrophosphate donne les phytoènes dont la deshydrogénation aboutit à la formation des caroténoïdes. Son hydrogénation engendre le phytol qui intervient sous forme estérifiée dans la structure des chlorophylles et participe à la biosynthèse des tocophérols. Les plastoquinones et ubiquinones dérivent de chaînes polyterpéniques (nona et deca prenylpyrophosphate) et sont présentes à l'état de traces dans les insaponifiables.

Les insaponifiables végétaux renferment d'autres familles de constituants comme des hydrocarbures et des alcools supérieurs de nature aliphatique.

Plan adopté pour l'étude des constituants de l'insaponifiable

Le Tableau IX, décrit dans le sens de formation des composés, peut fournir un plan pour l'étude des constituants terpéniques de l'insaponifiable. Les constituants non terpéniques seraient alors examinés en premier. Nous n'avons pas suivi cet ordre car il paraît difficile de dissocier l'analyse du squalène de celle des hydrocarbures. De même, les polarités et propriétés analogues des alcools

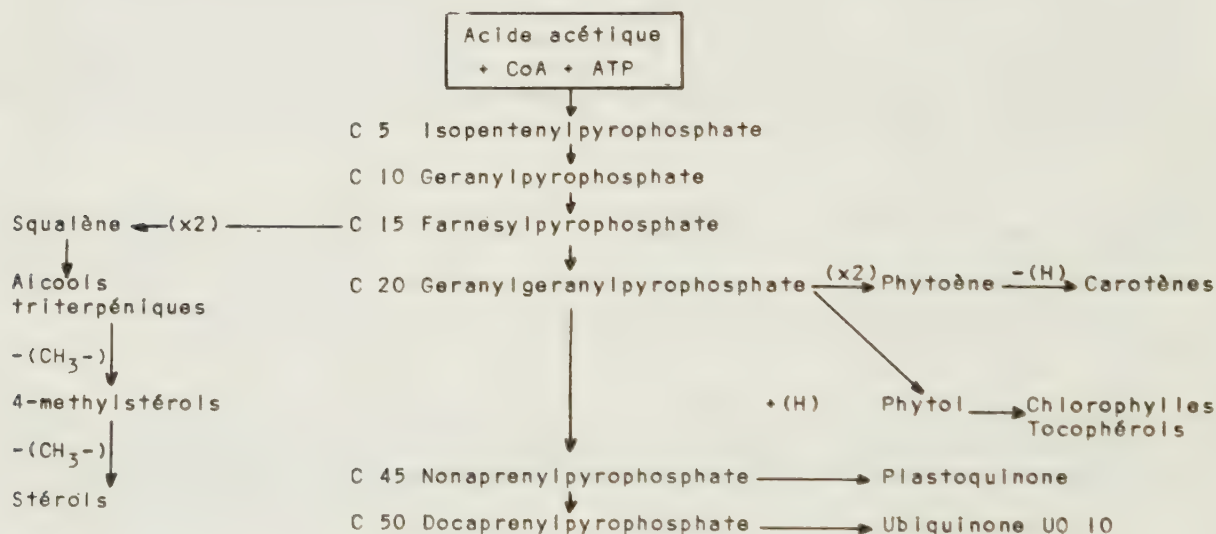
aliphatiques et terpéniques justifient de grouper ces deux types de constituants dans un chapitre commun. Enfin, à l'inverse du sens de la biosynthèse, nous avons d'abord examiné les propriétés et les méthodes d'analyse des stérois eux-mêmes, applicables aussi à leur dérivés méthylés.

L'ordre retenu sera le suivant :

- Hydrocarbures aliphatiques - Squalène
- Alcools aliphatiques et terpéniques
- Stérois
- Méthylstérois
- Cétones triterpéniques
- Pigments (caroténoïdes - Chlorophylles)
- Tocophérols

TABEAU IX

Biosynthèse des principaux terpénoïdes des insaponifiables végétaux



Introduction

Les hydrocarbures constituant la fraction la moins polaire de l'insaponifiable et, sous ce terme, on désigne généralement un ensemble de constituants qui, selon la configuration ou l'insaturation de leurs chaînes, pourront être classés en plusieurs groupes :

- les n-alcanes ou n-paraffines	Exemple n-tétracosane
- les isoalcanes ou isoparaffines	2-méthyl octacosane
- les alcènes	1-octadécène
- les hydrocarbures cycliques et polycycliques	anthracène
- les hydrocarbures terpéniques (squalène, carotène, zéaxanthène, etc...)	

Dans les huiles végétales, les hydrocarbures sont des constituants mineurs, même vis à vis de l'insaponifiable dont ils ne représentent que 1 à 10 %, exception faite de l'insaponifiable de l'huile d'olive pouvant renfermer jusqu'à 50 % de squalène (52). Plus précisément, les teneurs suivantes (rapportées à 100 g de corps gras) ont été trouvées : 45 mg pour le tournesol (91), 50 mg pour le soja (92), 104 mg pour le colza (23).

Cette fraction est caractérisée par un grand nombre de constituants, certains étant présents à l'état de traces. Dans l'huile de soja, NAKAMIYA et al. (10) identifient le squalène et le gadusène, DONIA et al. (93) le triacontane. Enfin, YAMADA (94) isole un mélange de paraffines en C28, C29, C30 et C32. Dans l'huile de tournesol, des hydrocarbures en C20 et C30 ont été signalés (95). CAPELLA et al. (96) montrent que, dans l'huile de colza, il existe des séries de n, iso et antéisoparaffines ayant des longueurs de chaîne de C11 à C31. Les paraffines supérieures, selon DEUEL (91), proviennent des cires cuticulaires qui sont dissoutes ou extraites au cours de l'obtention de l'huile brute ; les hydrocarbures terpéniques sont des intermédiaires (squalène) ou les termes (carotènes) de la biosynthèse, tandis que les hydrocarbures polycycliques ont une origine et un rôle peu connus. Ils ont été identifiés et évalués dans plusieurs huiles, en particulier par GRIMMER et HILDEBRANDT (92), leur très faible teneur (0,1 ppm ou moins) ne permet pas de les étudier selon la méthode désormais classique d'analyse de l'insaponifiable et leur analyse n'a pas été entreprise dans ce travail.

Obtention et fractionnement des hydrocarbures totaux

L'insaponifiable de 50 g d'huile de pression est préparé selon les deux méthodes de la Norme française (26). Comme le montre le Tableau X, l'extraction à l'hexane conduit généralement à une meilleure récupération des hydrocarbures.

L'insaponifiable, une fois isolé, est chromatographié. Etant donné leur très faible polarité, les hydrocarbures sont les premiers constituants élués dans la chromatographie sur colonne d'alumine ou de silice. En utilisant un collecteur de fractions, on recueille successivement les hydrocarbures aliphatiques puis le squalène (1). Néanmoins, avec ce type de chromatographie, il y a toujours un risque d'obtenir des fractions intermédiaires impures et nous avons préféré d'abord récupérer les hydrocarbures totaux, puis les rechromatographier préparativement sur couche de silice G. Un essai avec échantillon synthétique et en développant par du cyclohexane nous a donné les résultats suivants :

Hydrocarbures	RF
tétracosane	0,69
1-octadécène	0,62
cholestane	0,65
squalène	0,25
β carotène	0,10
benzopyrène	0,14

Les C.C.M. d'hydrocarbures de colza et soja comportent, entre les paraffines et le squalène, des bandes représentatives de constituants mineurs. L'une d'entre elles, de Rf inférieur à l'octadécène, est isolée puis chromatographiée en phase gazeuse. Il apparaît un constituant principal qui, dans nos conditions opératoires, a une longueur équivalente de chaîne à la n-paraffine en C19. Il pourrait correspondre au gadusène précédemment signalé mais, faute d'étalon, nous ne pouvons pas le confirmer.

TABLEAU X

Huile	Solvant d'extraction (*)	Poids d'insaponifiable en mg, rapporté à 100 g d'huile	Poids des hydrocarbures totaux en mg	poids de squalène en mg
Colza	A	710	57	22
	B	948	44	
Soja	A	672	44	15
	B	800	36	
Tournesol	A	560	40	25
	B	670	33	
(*) A (hexane) B (éther éthylique)				

A. LES ALCANES

Chromatographie en phase gazeuse des alcanes

Le mélange de paraffines isolées sur plaque est analysé qualitativement et quantitativement par chromatographie en phase gazeuse isotherme puis programmée. L'identification a été possible par coinjection d'étalons (n-paraffines en C₁₈, C₂₄, C₂₈) et par construction des droites vérifiant la relation existant entre les distances de rétention et le nombre d'atomes de carbone de la chaîne (Tableau XI).

Qualitativement

A côté d'une série de n-paraffines, qui sont les principaux constituants et dont le nombre d'atomes de carbone est compris entre 13 et 33, il existe généralement dans les trois cas les iso et anté-isoparaffines correspondantes. On note une différence d'aspect des chromatogrammes au niveau des premiers termes lorsqu'il s'agit d'huile de pression ou d'extraction et cette distinction est particulièrement nette pour le colza (figure 14).

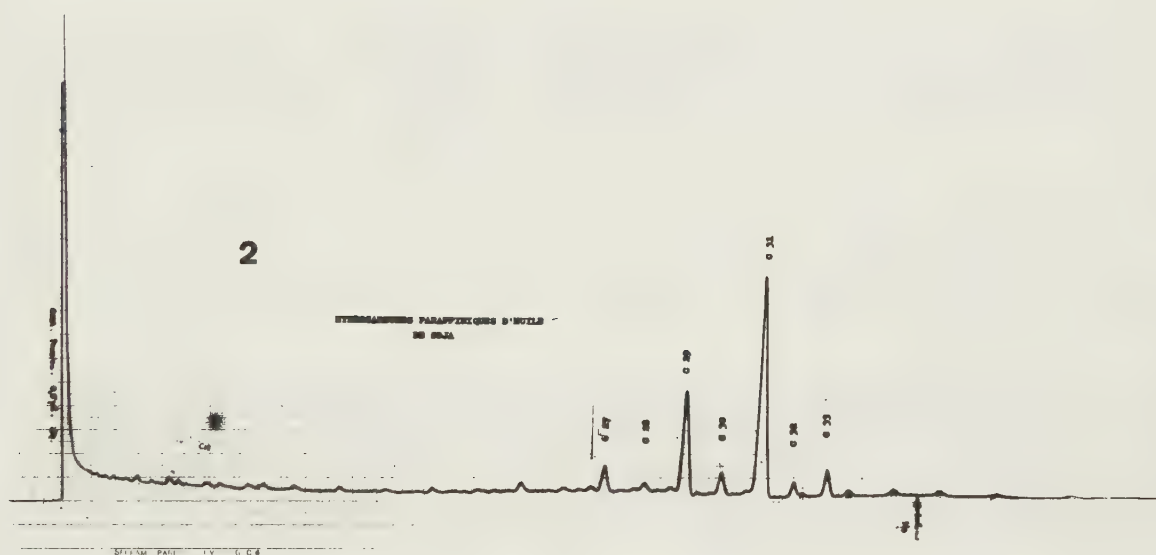
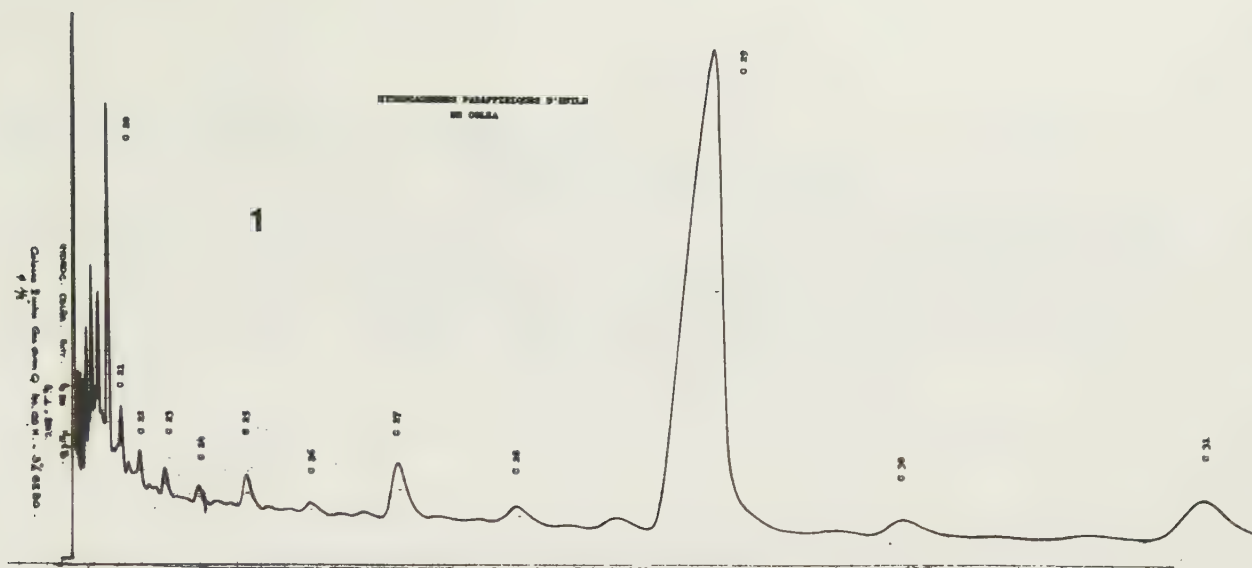


TABLEAU XI

Composition des hydrocarbures saturés contenus dans les huiles
de colza, soja et tournesol

n-alcanes	colza	soja	tournesol
13-14-15	traces	traces	-
16	0,2	0,3	
17	0,2	0,3	
18	0,9	0,5	
19	0,9	0,6	
20	3,3	0,6	14,0
21	0,6	0,6	
22	0,6	0,3	
23	0,5	0,6	2,1
24	0,7	0,4	
25	1,2	0,4	1,5
26	1	0,6	0,4
27	3,1	4,6	8,2
28	2	2,4	1,8
29	74,3	19,6	32,4
30	2,5	4,5	2,6
31	8	52,6	34,2
32		3	0,7
33		7,2	2,0

Quantitativement

Les hydrocarbures de colza sont principalement constitués de n-nona-cosane (74,3 %) que l'on retrouve dans les hydrocarbures de soja (19,6 %) et de tournesol (32,4 %), ceux-ci renfermant surtout du n-untriacontane (respectivement 52,6 et 34,2 %). Pour le tournesol, il faut noter la présence d'un hydrocarbure ayant une rétention analogue au n-alcane en C₂₀, mais qui est un mélange de deux constituants non identifiés. Dans les trois cas, nous remarquons l'importance des termes à nombre de carbone impair par rapport aux termes pairs.

B. LE SQUALÈNE

La fraction insaturée des hydrocarbures est essentiellement constituée de squalène qui est un triterpène comportant six doubles liaisons régulièrement réparties et dont la formule brute est C₃₀H₅₀. MARKLEY et al. (99) lui attribuent une signification biologique et son rôle de précurseur des triterpènes cycliques et des stéroïdes a été par la suite confirmé. Dans l'huile de soja, GOVIND RAO et al. (100) soulignent son activité antioxygène et font remarquer que la faible teneur en tocophérols de l'huile d'olive semble compensée par des quantités importantes (200 - 500 mg/100 g d'huile) de squalène qui devient alors le premier constituant mineur. Nous avons décrit, dans ce cas particulier, une méthode de dosage direct par chromatographie en phase gazeuse des esters méthyliques (101).

Pour les trois huiles étudiées, les teneurs en squalène sont normales (10 à 50 mg/100 g d'huile) et il faut obligatoirement préparer l'insaponifiable. Les chiffres trouvés et figurant dans le Tableau X ont été obtenus par la mesure de l'indice d'iode selon la méthode recommandée par l'AOAC (102). Après fractionnement sur colonne des hydrocarbures, le squalène peut aussi être dosé par chromatographie en phase gazeuse en prenant le squalène comme étalon interne (32).

Mise au point d'un dosage du squalène

Le squalène et le squalane, chromatographiés avec des paraffines, ont respectivement des longueurs équivalentes de chaînes identiques aux termes normaux en C 28 et C 26,6. Dans les compositions précédemment déterminées, ces deux n-paraffines sont mineures et, étant donné le rapport des quantités squalène/paraffine, il devient possible, au prix d'une erreur très réduite (1 %), de doser le squalène en injectant directement les hydrocarbures totaux auxquels on a ajouté l'étalon interne. Les déterminations de ce type nécessitent très peu de substance et les quantités récupérées sur plaque sont alors suffisantes.

Néanmoins, l'obtention de résultats convenables dépendra de plusieurs précautions opératoires :

- La couche de silice est débarrassée des polluants qu'elle peut contenir, soit par lavage à l'éther éthylique, soit par extraction au soxhlet de l'adsorbant avant confection des plaques. L'indicateur fluorescent est incorporé dans le mélange à étaler.

- Il faut vérifier que des quantités connues de squalène sont quantitativement récupérées après développement de la plaque. Nous avons déposé préparativement des solutions contenant de 200 μ g à 1 mg et les taux de récupération ont toujours été supérieurs à 95 %, à condition de gratter et d'extraire la bande immédiatement au sortir de la cuve.

- L'insaponifiable de 5 g d'huile a été préparé sous gaz inerte (azote). Le dosage fut effectué sur huile de soja et de tournesol (figure 15). Il donna des résultats très comparables à ceux obtenus par la méthode classique (soja : 14,1 mg/100 g, tournesol : 25,1 mg/100 g). Il nécessite peu d'insaponifiable et a l'avantage d'employer le fractionnement sur plaque qui peut être utilisé pour d'autres déterminations (composition stérolique, etc...).

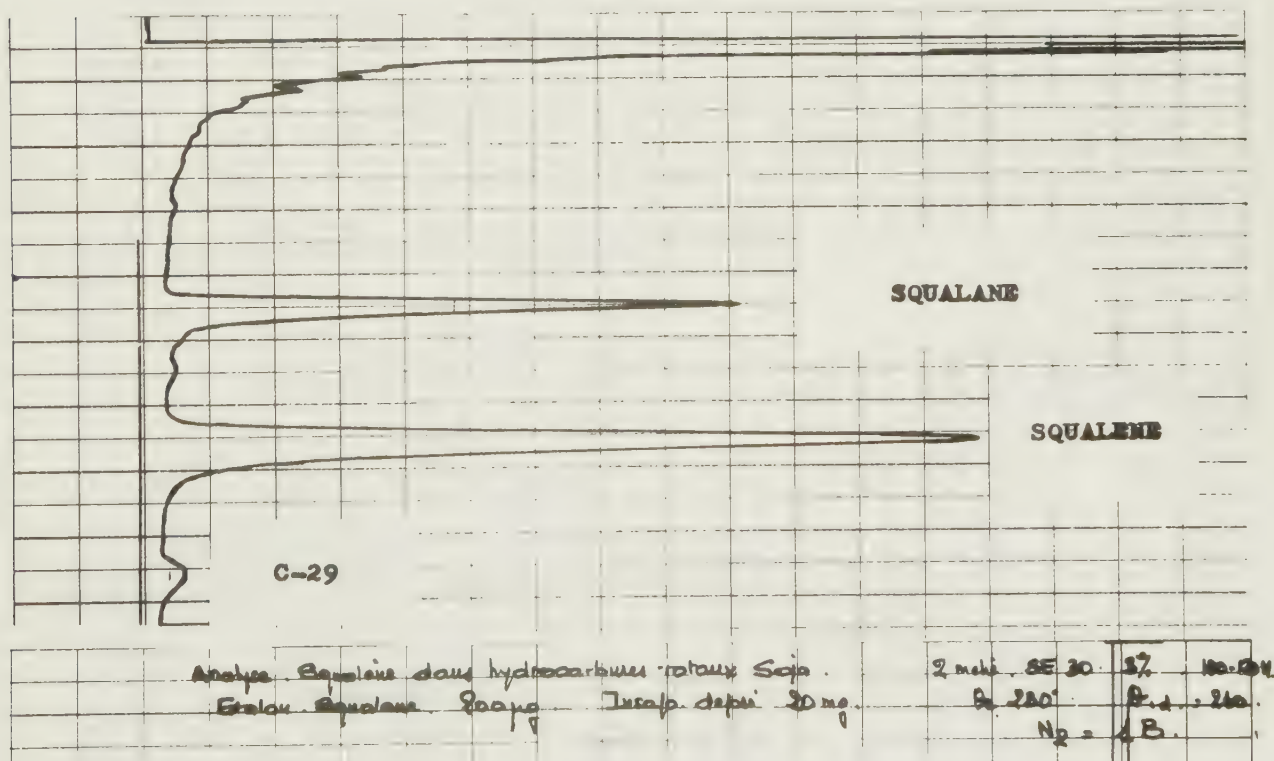


Figure 15

Dosage du squalène par chromatographie en phase gazeuse

Parmi les constituants hydroxylés de l'insaponifiable, le groupe des alcools est assez important ; il renferme principalement deux types de composés, de structures différentes, avec néanmoins des propriétés communes, des polarités semblables, expliquant les difficultés rencontrées pour en faire la complète séparation. Nous étudierons donc, dans un même chapitre, alcools aliphatiques et alcools terpéniques, dont nous rappellerons cependant les particularités.

Etat naturel des alcools aliphatiques et terpéniques

1. Alcools aliphatiques

Dans le règne végétal, l'huile de grignon d'olive est l'une des plus riches en alcools gras, FURHMANN (103) ayant trouvé des teneurs comprises entre 0,2 et 0,3 %. Depuis, il a été établi (62) que la plupart des autres corps gras en contiennent aussi, mais dans des proportions moindres (0,01 à 0,1 %). La présence d'alcools aliphatiques supérieurs (C_{16} à C_{30}) dans les huiles végétales s'explique en partie en considérant qu'elles renferment presque toujours des cires d'origine cuticulaire entraînées au cours de la pression ou de l'extraction. La cire de tournesol, isolée par BARENTHER (104), peut représenter 0,03 à 0,35 % de l'huile brute (105). Une cire de soja a été étudiée par EARLE et al. (106) et l'huile traitée pour son isolement n'en contenait que 0,002 %. En aussi faible quantité dans l'huile, la cire est totalement transformée par la saponification et les alcools de constitution se retrouvent dans l'insaponifiable. Il serait intéressant de comparer les compositions d'alcools déterminées à partir de l'insaponifiable à celles obtenues après scission des esters céreux, comme par exemple les ont décrit GUILLAUMIN et al. (107) pour la cire de tournesol.

2. Alcools terpéniques

A l'état naturel, ces composés sont libres ou bien engagés dans des combinaisons de type glucosidique (saponines). TSUDA (108) isole, de la graine de soja, le sojasapogénol ($C_{30}H_{50}O_3$). ZIMMERMANN (109) identifie l'arnidiol et le faradiol dans la fleur de tournesol ; enfin, TAMURA et al. (110) signalent la présence de cycloarténol dans l'huile de colza. Dans les huiles végétales, on rencontre surtout des monoalcools. JACINI et CAPELLA (111) ont montré que les alcools triterpéniques sont des constituants normaux de l'insaponifiable. La composition qualitative de cette fraction a été examinée pour dix-huit variétés d'huile (28). Le cycloarténol et le 24-méthylène cycloartanol sont toujours présents. Occasionnellement, on rencontre les amyrines (β et plus rarement α), le butyrospermol, l'euphorbol, le cyclolaudénol. Le phylol est un alcool diterpénique très largement distribué, il est seul ou accompagné de geranylgeraniol, de farnesol et même de linalol (112), ces derniers constituants étant trop volatils pour être quantitativement récupérés dans nos conditions opératoires.

Propriétés des alcools aliphatiques et terpéniques

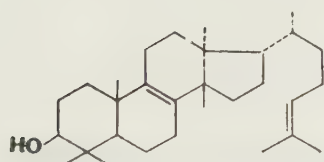
1. Propriétés communes

Le groupement hydroxyle avec divers réactifs (anhydride acétique, anhydride trifluoroacétique, triméthylchlorosilane, acide dinitrobenzoïque) donne des dérivés moins polaires que la molécule libre utilisée pour l'analyse par chromatographie en phase gazeuse.

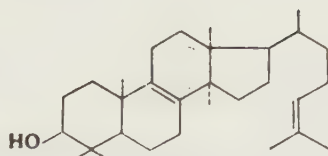
2. Propriétés particulières des alcools triterpéniques

a) Constitution

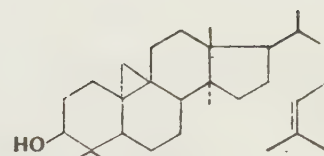
I TRITERPENES TETRACYCLIQUES



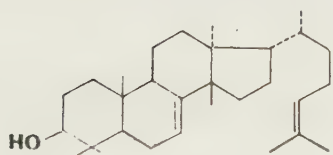
(I) Euphol



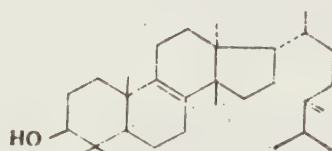
(V) Lanostérol



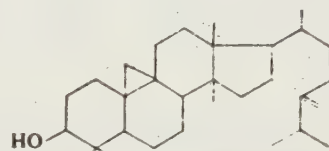
(IX) Cycloarténol



(II) Butyrospermol

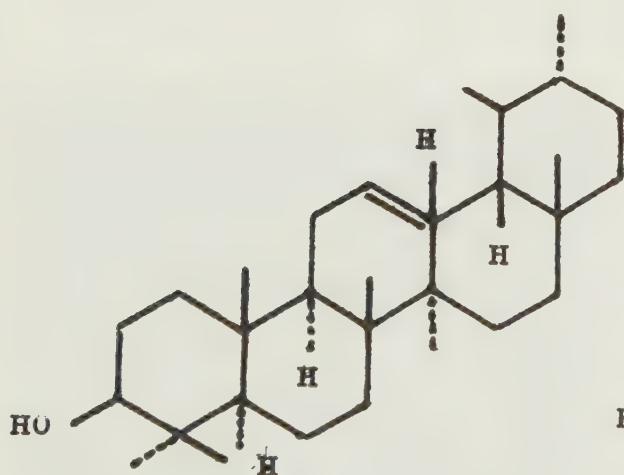


(IV) Euphorbol

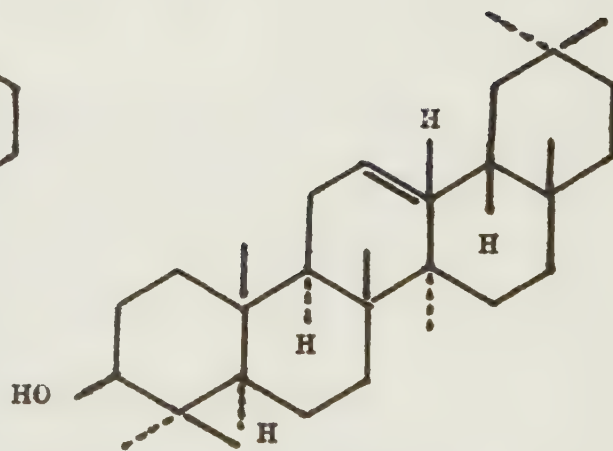


(X) Méthylène-24-Cycloartanol

II TRITERPENES PENTACYCLIQUES



α - amyrine



β - amyrine

TABLEAU XII

La plupart des alcools triterpéniques rencontrés dans les huiles alimentaires possèdent un noyau tetracyclique et, parfois, pentacyclique (amyrines). Un inventaire très complet de l'état naturel et des propriétés de ces composés est dressé par BOITEAU et al. (113). Quelques formules d'alcools triterpéniques sont rassemblées dans le Tableau XII. La parenté entre les alcools tetracycliques et stéroïdes est étroite. Ces alcools peuvent être considérés comme des triméthylstéroïdes ou bien on dira que les stéroïdes dérivent des triterpènes par déméthylation, ce qui, dans certains cas particuliers, a été démontré (114). Il faut noter cependant une particularité des alcools triterpéniques : aucun d'entre eux ne possède une double liaison en position 5, trait commun à de nombreux stéroïdes.

b) Propriétés

Réactions colorées - Avec le réactif de Liebermann-Buchard, on observe une coloration jaune (agrostérol) ou brune. Les halogénures d'antimoine donnent des colorations variables (violet, rose brun, ...) évoluant avec le temps et la température. Plus caractéristique est la réaction de Fitelson (32) indiquant la présence d'eupholanostérols et particulièrement de butyrospermol. Elle serait due à une position 17 α de la chaîne latérale.

Réactions de la double liaison - Les différences d'insaturation ou de position des doubles liaisons dans la molécule favorisent la formation de composés d'addition séparables par chromatographie.

Analyse des alcools de l'insaponifiable

Les difficultés rencontrées pour fractionner correctement les alcools aliphatiques et terpéniques contenus dans les insaponifiables peuvent être résolues par chromatographie sur couche de silice G avec cuves de faible épaisseur, à condition que les mélanges contiennent peu ou pas de méthylstéroïdes (ces derniers composés interférant alors avec les alcools aliphatiques). Sinon, le développement multiple avec un solvant de faible polarité permet d'isoler, d'une part la fraction méthylstéroïdes, d'autre part un mélange d'alcools aliphatiques et terpéniques. Nous avons étudié surtout cette dernière possibilité.

Chromatographie en phase gazeuse des alcools totaux

Les principaux alcools aliphatiques végétaux sont des termes saturés de C₂₂ à C₂₈, les alcools di et triterpéniques ont respectivement des longueurs équivalentes de chaîne voisines de C₂₀ et C₃₀. Par chromatographie en phase gazeuse des alcools totaux, l'ordre d'éluion sera : alcools diterpéniques, aliphatiques et triterpéniques avec seulement de faibles interférences entre ces différentes classes (115).

Des mélanges connus d'alcools aliphatiques (octadecanol, docosanol) et triterpéniques (lin) ont été chromatographiés préalablement à l'injection des alcools totaux des trois huiles. Nous avons pu déterminer qualitativement, puis quantitativement, la composition de cette fraction dans chaque cas (figure 16). L'identification des alcools triterpéniques est possible à l'aide du mélange étalon et par comparaison avec les valeurs de rétention relatives au cycloarténol (52). Les séparations sont améliorées par la chromatographie des alcools à trois températures : 260°, 240°, 220°. Les compositions figurant dans le Tableau XIII peuvent être rapprochées de celles que donne J.P. WOLFF (116) et qui sont établies après fractionnement sur plaques horizontales de 40.

2. Chromatographie sur couche mince des alcools totaux

Sur couche de silice G imprégnée à 5 % de nitrate d'argent, IKAN (117) sépare plusieurs alcools triterpéniques libres. PONSINET et OURISSON (118) ont développé une méthode qui consiste à époxyder les acétates d'alcools par l'acide paranitroperbenzoïque avant de les chromatographier sur couche de silice G (double développement cyclohexane-acétate d'éthyle 85:15). Il se forme des mono et des diepoxides. Les R_f relatifs à l'acétate de cycloarténol époxydé sont les suivants :

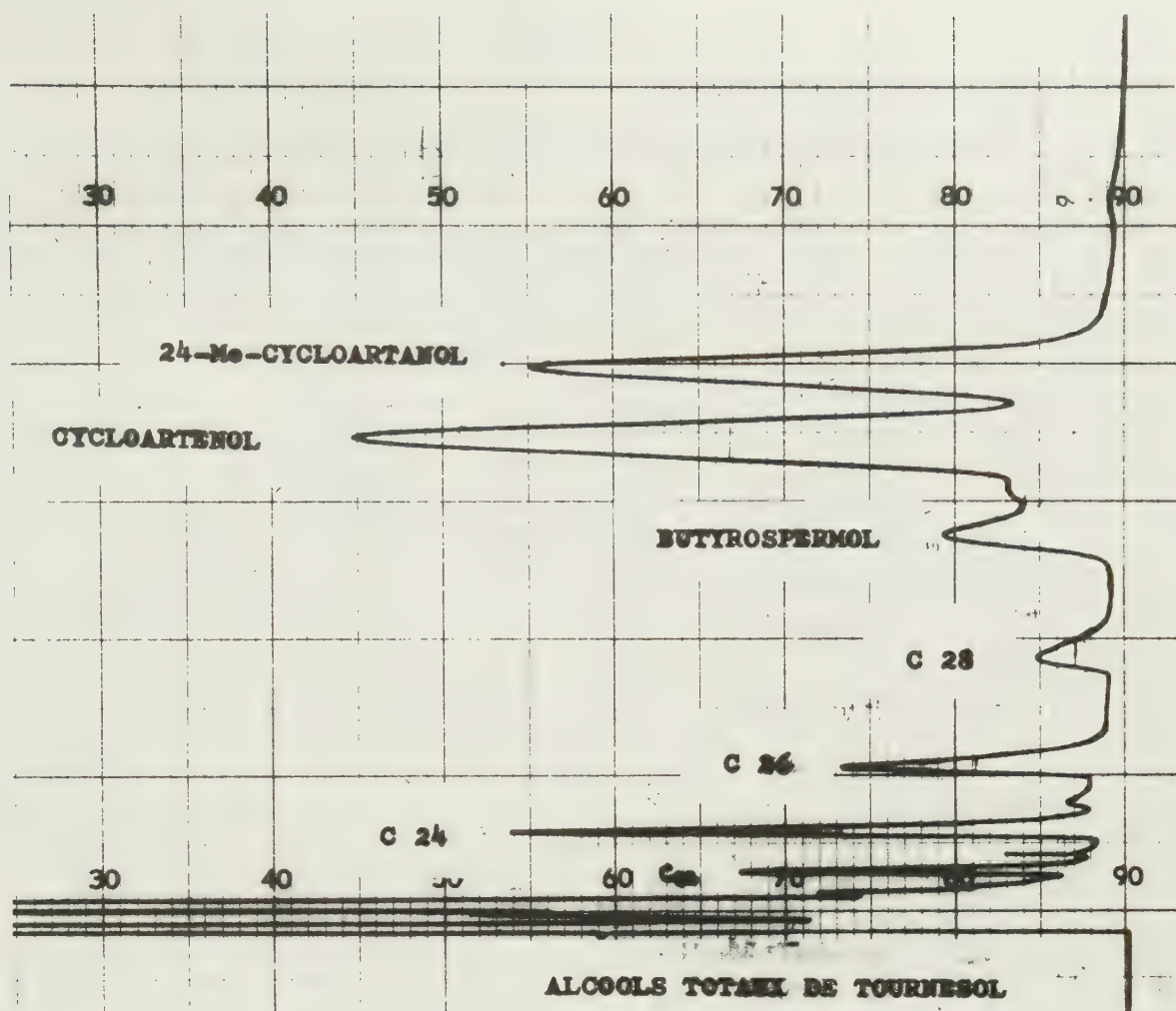


Figure 16

Chromatographie en phase gazeuse
des alcools totaux de tournesol

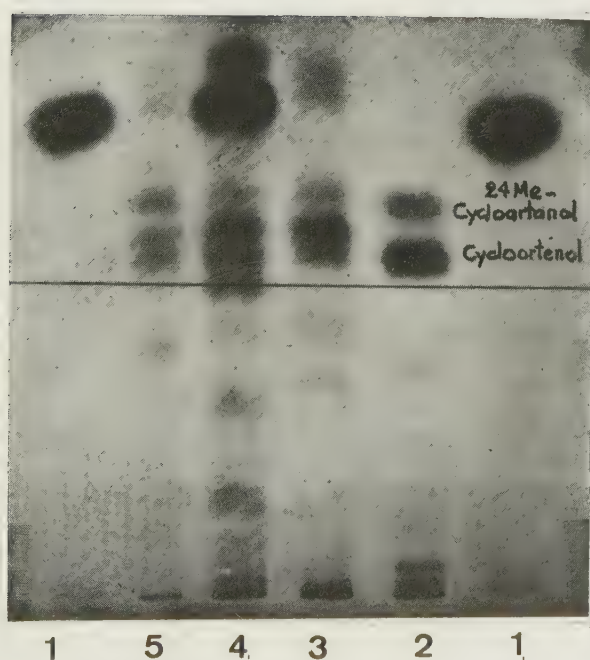


Figure 17

Chromatographie sur plaque de silice G
des acétates d'alcools époxydes
Dev. : cyclohexane-acétate d'éthyle
(85-15)

- 1, alcool stéarylique
- 2, alcools triterpéniques de lin
- 3, alcools totaux de colza
- 4, alcools totaux de soja
- 5, alcools totaux de tournesol

TABLEAU XIII

Chromatographie en phase gazeuse des alcools totaux

Constituants	Alcools totaux			
	Colza	Soja	Tournesol	
			huile	cire
<u>Alcools aliphatiques</u>				
C 18	non cal			1,74
C 20	20		7	8,01
C 22	23	33	14	17,01
C 24	8	15	34	30,82
C 26	22	18	30	22,41
C 28	18	34	15	0,55
<u>Alcools triterpéniques</u>				
?	6			
?	13	7		
butyrospermol		35	11	
cycloarténol	58	38	54	
24-me-cycloartanol	23	19	35	

Mono-epoxydes

- dihydroeuphorbol	)	1,26
- dihydroeuphol	)	
- dihydrobutyrospermol	)	1,17
- 24-méthylène cycloartanol	)	1,12
- cyclolandenol	)	
- cycloarténol	)	<u>1,00</u>

Di-epoxydes

- euphorbol	0,95
- euphol	0,71
- lanostérol	0,60
- butyrospermol	0,59

Nous reprenons ici cette méthode. Après époxydation, les acétates d'alcool stéarylique, d'alcool triterpénique de lin (référence), d'alcools totaux de colza, tournesol et soja, sont déposés sur plaque de silice G. L'alcool stéarylique, non époxydable, est le moins retenu. Les alcools triterpéniques de lin permettent de repérer facilement le cycloarténol, le 24-méthylène cycloartanol, l' α -amyrine (figure 17). Les trois huiles renferment le cycloarténol et le 24-méthylène-cycloartanol, ce dernier étant peu abondant dans le soja et non pas absent (52). D'autres alcools ont été identifiés par comparaison avec les valeurs précédentes (Tableau XIV) :

Le fractionnement des acétates époxydés montre la complexité du mélange des alcools terpéniques dont la chromatographie en phase gazeuse ne rend que très partiellement compte.

3. Préparation de substances de référence :alcools triterpéniques de lin

L'insaponifiable de l'huile de lin est chromatographié sur colonne de silice Mallinckrodt dans les conditions précédemment indiquées. Un premier fractionnement permet d'isoler des alcools triterpéniques impurs qui sont re-chromatographiés dans les mêmes conditions. L'analyse par chromatographie sur couche mince montre que les fractions 31 à 35 sont constituées d'alcools triterpéniques pratiquement purs, ce que nous confirmons par détermination de la composition par chromatographie gazeuse (α -amyrine = 15 %, cycloarténol = 68 %, 24-méthylène cycloartanol = 17 %). (Figure 18).

TABLEAU XIV

Chromatographie sur plaque de silice G des acétates epoxydés

Rf des bandes relatif au cycloarténol = 1				Identification
Lin	Colza	Tournesol	Soja	
0,70		0,58	0,34 0,60	? butyrospermol α -amyrine euphol
	0,76	0,75	0,73	? ?
	0,95	0,86	0,95	euphorbol
1,12	1,13	1,12	1,12	cycloarténol
			1,18	24-me-cycloartanol
		1,35	1,35	dihydrobutyrospermol alcools aliphatiques

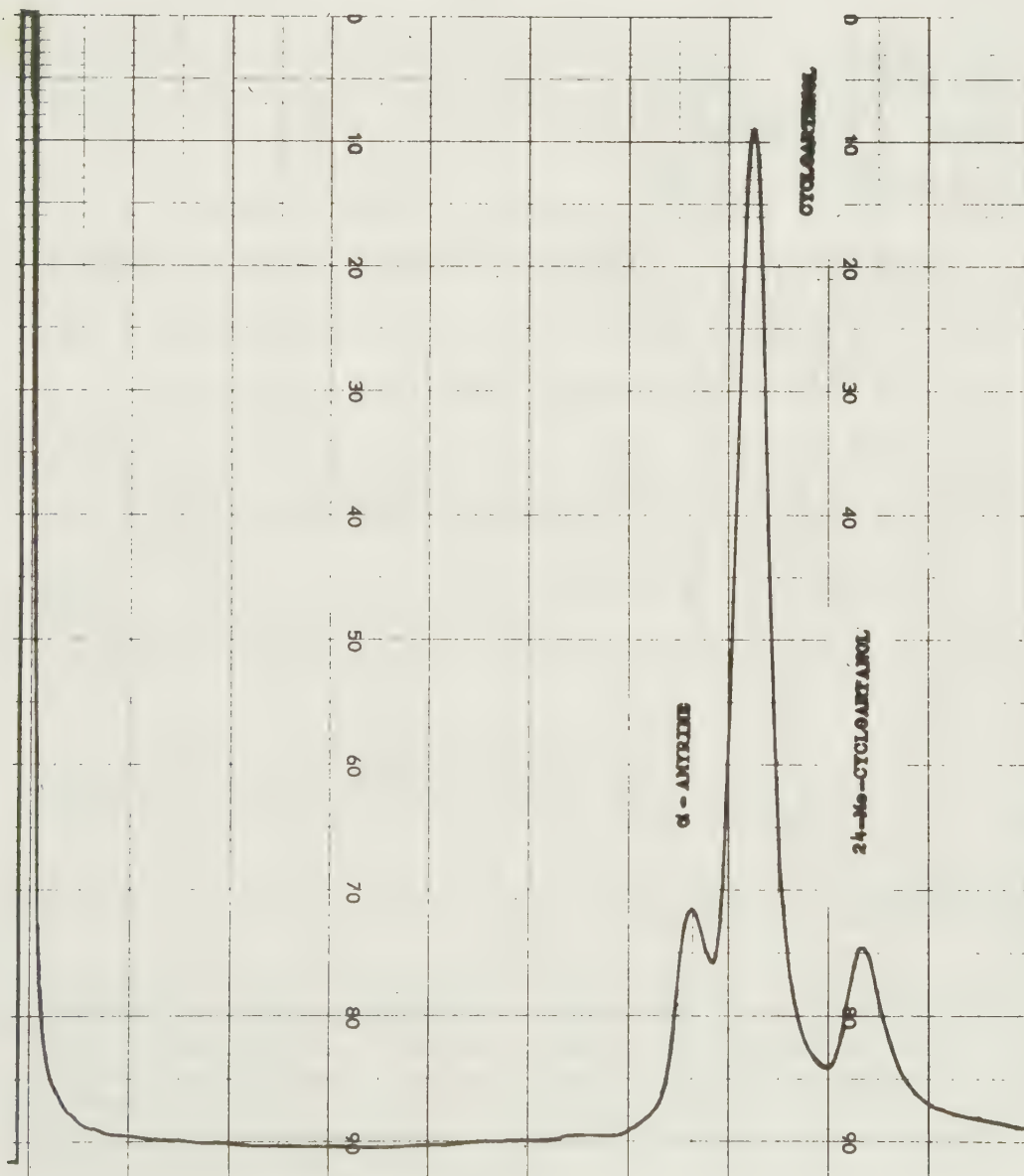


Figure 18

Chromatographie en phase gazeuse des alcools triterpéniques de lin

A l'origine, le nom de stérols a été attribué aux alcools solides obtenus à partir d'insaponifiables d'extraits lipidiques. Les stérols d'origine végétale sont appelés phytostérols par opposition aux zoostérols dont le cholestérol est le représentant le plus connu. Mais il a été démontré que le cholestérol existe chez certains végétaux inférieurs comme l'algue rouge (119), puis il a été prouvé que des végétaux supérieurs (120) et des pollens (121) en contenaient. Sa présence en petite quantité a été décelée dans quelques huiles alimentaires : palme (122), arachide (1), colza (123). Les récents travaux sur la biosynthèse des phytostérols ont prouvé que les stérols bien connus et d'autres tels que les méthylstérols dériveraient tous d'un même constituant, le cycloarténol. Chacun d'entre eux pourrait représenter des intermédiaires ou le terme de différentes voies biosynthétiques. Parmi ces intermédiaires, il apparaît que les Δ^7 sténols sont des précurseurs des Δ^5 sténols. Le Δ^7 cholesténol se forme avant le cholestérol (124) et chez les végétaux supérieurs la conversion du Δ^7 stigmasténol en β sitostérol a été étudiée (125). La présence de Δ^7 sténols est signalée dans de nombreux mélanges stéroliques naturels (épinards, avoine, certains pollens, etc...) L'hétérogénéité de composition de ces mélanges a été soulignée par KNIGHTS (126) et LINDE et al. (127).

Pour une meilleure compréhension, nous avons rappelé des notions concernant la nomenclature et l'isomérisation des stéroïdes en nous aidant de l'ouvrage de KLYNE (128), puis des propriétés physiques et chimiques ayant rapport avec l'analyse, appliquant ces données au cas particulier des trois huiles étudiées.

Stéreochimie et nomenclature des stérols

1. Les stérols ont pour structure de base un noyau perhydrocyclopentanophénanthrène portant divers substituants :

- un hydroxyle en position 3
- des groupements méthyl en 10 et 13, plus rarement en 4 (4-méthylstérols)
- une chaîne latérale en 17.

- Dans les stérols naturels, l'enchaînement des cycles est tel que l'ensemble polycyclique, est d'une configuration plane. La jonction A/B est cis ou trans ; l'hydrogène en 5 est donc au-dessus (β) ou en-dessous du plan (α).

- Si un groupement se trouve au-dessus du plan défini par le système polycyclique, il sera orienté en β (—) ; s'il se trouve en-dessous, on parlera d'une orientation α (----).

. les méthyls en 10 et 13 sont au-dessus du plan du noyau polycyclique (β) ainsi que l'hydroxyl en 3.

. la chaîne latérale est aussi en position β .

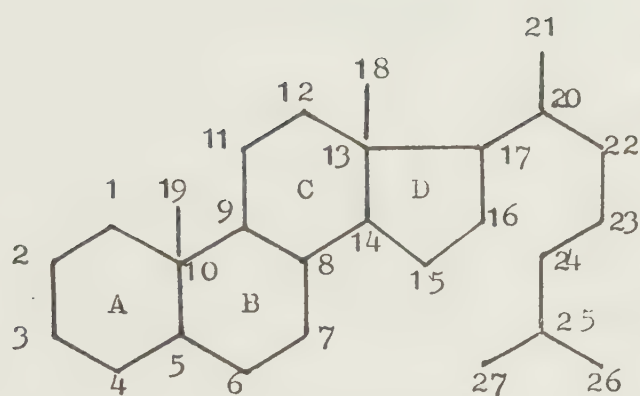
2. La dénomination correcte des stérols est obtenue en prenant l'hydrocarbure de base (cholestane) et en appliquant les règles de nomenclature pour les stéroïdes (129) (Tableau XV).

Etat naturel des stérols dans l'huile

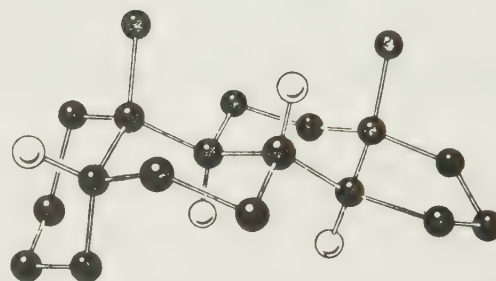
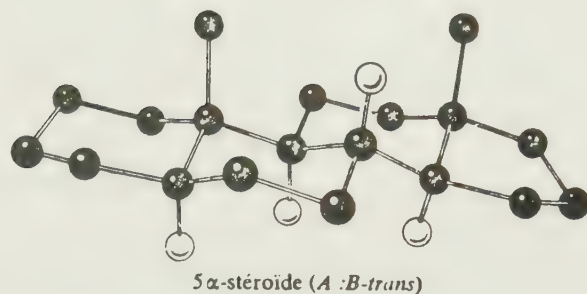
Avant la saponification de l'huile, les stérols sont présents à la fois à l'état libre et sous forme liée. Dans ce dernier cas, ils sont engagés dans des combinaisons de type ester ou même plus complexe - (glucoside). KIRIBUCHI et al. (130) ont isolé des steryl 6 acylglucosides à partir d'huile de soja et ont séparé sur colonne de florissil ; stérols, esters de stérols, glucosides. FEDELI et al. (29), en analysant des lipides extraits de différentes parties anatomiques de la graine de soja, montrent que l'huile de germe peut contenir jusqu'à 13 % d'insaponifiable principalement constitué de stérols et d'alcools triterpéniques, ce qui signifierait que ces constituants jouent un rôle important

TABLEAU XV

NOMENCLATURE ET ISOMERIE DES STEROLS



STÉRÉOCHIMIE



Désignation usuelle	Désignation selon nomenclature	formule
Cholestane	Cholestane	C ₂₇ H ₄₈
Cholestanol	Cholestanol-3 β	C ₂₇ H ₄₈ O
Cholestérol	Cholestène-5 ol-3 β	C ₂₇ H ₄₆ O
Campestérol	Méthyl-24 Cholestène-5 ol-3 β	C ₂₈ H ₄₈ O
Brassicastérol	Méthyl-24 Cholestadiène-5-22 ol-3 β	C ₂₈ H ₄₆ O
Ergostérol	Méthyl-24 Cholestatriène-5-7-22 ol-3 β	C ₂₈ H ₄₄ O
Stigmastérol	Ethyl-24 Cholestadiène-5-22 ol-3 β	C ₂₉ H ₄₈ O
β .Sitostérol	Ethyl-24 Cholestène-5 ol-3 β	C ₂₉ H ₅₀ O
Citrostadiénol	Méthyl-4 α Ethylidène-24 (5 α) Cholestène-7 ol-3 β	C ₃₀ H ₅₀ O
Lanostérol	Triméthyl-4-4-14 Cholestadiène-8-24 ol-3 β	C ₃₀ H ₅₀ O

dans les mécanismes de la germination. Habituellement, les teneurs sont plus faibles et COPIUS PEERBOOM (131) donne les valeurs suivantes :

TABLEAU XVI

Huile	Stérols %		
	Totaux	Libres	Estérifiés
colza	0,62	0,27	0,35
soja	0,34	0,22	0,12
tournesol	0,35	0,16	0,19

Par saponification, les formes liées sont détruites et le dosage que nous avons effectué ne rend compte que des stérols totaux.

Caractérisation des stérols par réaction colorée

Parmi les nombreuses réactions colorées décrites dans la littérature, celle de LIEBERMANN-BUCHARD est la plus connue. Les stérols en solution chloroformique sont traités par un mélange d'anhydride acétique et d'acide sulfurique concentré. Il se forme une coloration verte dont la vitesse de développement est en relation avec la structure de la molécule et particulièrement la position des doubles liaisons. Les Δ 5-sténols présentent une coloration d'intensité maximum au bout de 20 à 30 minutes, alors que les Δ 7-sténols donnent une teinte bleue virant ensuite au vert en 2 minutes ou moins. Les stanols ne réagissent pratiquement pas. La réaction de MOORE BAUMANN (132) permettant de reconnaître les Δ 7-sténols est basée sur cette propriété.

Propriétés physiques et chimiques ayant rapport avec l'analyse

1. Physiques

En ce qui nous concerne, la spectrophotométrie infrarouge et la spectrométrie de masse trouvent application :

- Le stigmastérol, dont la chaîne latérale comporte une double liaison de configuration trans, absorbe dans l'infrarouge à $10,3\mu$. Mettant à profit cette propriété, JOHNSON (133) a décrit une méthode de dosage du stigmastérol dans les stérols totaux de soja.

- Pour confirmer l'existence du Δ 7-stigmastérol dans l'huile de tournesol et la présence de méthylstérols dans les trois huiles étudiées, nous avons utilisé la spectrométrie de masse.

2. Chimiques

Il faut citer principalement deux grands types de réactions :

a) Réactions portant sur la double liaison

. L'hydrogénation catalytique à froid en milieu acétique avec le noir de platine ou le palladium donne, selon l'insaturation de la molécule et la position des doubles liaisons des substances plus hydrogénées ou saturées. La double liaison 7-8 ne s'hydrogène pas (128).

. Formation de complexes avec Ag^+ . Les doubles liaisons avec l'ion Ag^+ donnent des complexes utilisés pour la séparation de mélanges stéroïdiques sur couches de silice (64) (134) (135) ou d'alumine (136) (137) imprégnée de nitrate d'argent. La stabilité des complexes formés dépend du nombre de doubles liaisons de la molécule mais aussi de leur position. Selon ALLAIS et BARBIER, la double liaison en 5 est très active puis, dans l'ordre d'activité décroissante, viennent les liaisons éthyléniques $\Delta 7$, $\Delta 24 - (25)$, $\Delta 24 - (28)$, puis $\Delta 22$.

b) Réactions portant sur l'hydroxyle

Le groupement hydroxyle en 3 communique à la molécule une assez forte polarité qu'il est avantageux de réduire par formation de dérivés plus faciles à séparer (acétates, silylethers)

Dosage des stérols totaux dans l'insaponifiable

Le dosage des stérols par pesée des digitonides est d'un usage très répandu bien que non spécifique des stérols eux-mêmes. Il est reconnu en effet que la digitonine donne des complexes stables avec les 3β hydroxystéroïdes ; à la limite, certains alcools triterpéniques peuvent être considérés comme des triméthylstérols (lanostérol) et donnent aussi une combinaison précipitable. La présence de quantités notables d'alcools triterpéniques dans les insaponifiables étudiés nous a fait écarter cette méthode classique de dosage et préférer les résultats de la gravimétrie exposés antérieurement (2ème partie).

Fractionnement des mélanges stéroliques

Les stérols totaux isolés soit par chromatographie sur colonne soit sur plaque préparative peuvent être rechromatographiés sur couche mince ou en phase gazeuse.

1. Chromatographie sur couches minces

- a) Couches imprégnées de nitrate d'argent (cf. propriétés chimiques, p. 36)
- b) Couche de Kieselguhr imprégnée d'undecane.
Les acétates de stérols totaux peuvent être séparés en leurs constituants par chromatographie en phase inversée suivant la méthode de COPIUS PEERBOOM (131).
- c) Couches contenant de la magnésie.
Dans la méthode proposée par SEHER (138), les acétates sont déposés sur une couche d'adsorbant qui est un mélange de magnésie, d'alumine G et de plâtre. La magnésie améliore les séparations.

2. Chromatographie en phase gazeuse

Les premiers essais d'analyse de mélanges stéroliques par chromatographie en phase gazeuse sont décrits par BERTHUIS et RECOURT (139) et s'accompagnent de très nombreux travaux comme ceux de VANDENHEUVEL et HORNING (140) qui précisent les conditions opératoires les plus favorables à la séparation de stéroïdes simples ou multifonctionnels. Du point de vue analytique, la connaissance de la composition stérolique d'un corps gras est devenue un précieux indice car EISNER et al. (141) puis KARLESKIND et al. (142) ont établi que la teneur en stérols totaux pour une même espèce de corps gras peut varier selon l'origine, mais que la composition du mélange est assez définie et constitue un élément d'appréciation de la pureté lorsque l'examen des acides gras s'avère insuffisant

pour confirmer l'hypothèse d'une adultération. La qualité des séparations est en rapport avec plusieurs facteurs expérimentaux concernant la confection de la colonne, le réglage des températures de l'appareil, la forme sous laquelle l'échantillon est injecté.

La colonne

Plusieurs auteurs travaillant sur stéroïdes hormonaux recommandent l'utilisation de tube en verre ; cependant, il a été montré (142) que l'acier donne aussi de bons résultats, et, selon ROZANSKI (143) ayant chromatographié des stéroïdes de soja sur colonnes de ces deux matériaux, il est difficile d'éviter les effets d'un début de décomposition si les colonnes ne sont pas correctement maturées. Le préconditionnement de la colonne a donc plus d'importance que la nature de sa paroi. Comme support, le Gas Chrom P est très souvent cité, il jouit en effet d'une grande aptitude à la séparation des produits polaires. La granulométrie intervient dans l'efficacité de la colonne et des valeurs de 80-100 Mesh ou 100-120 Mesh sont les plus courantes. Les polyalkylsiloxanes du type SE 30 constituent une phase stationnaire adéquate, le taux d'imprégnation étant faible (3 à 1 %).

Les températures

Les températures de colonne et de détecteur sont semblables (240-250°) alors qu'une complète vaporisation nécessite de chauffer davantage l'injecteur (260°C).

Injection de dérivés (esters ou éthers)

Ceux-ci améliorent la qualité des séparations et la régularité des pics. Une microméthode particulièrement rapide pour préparer les silyléthers a été décrite et expérimentée par PREVOT et BARBATI (144). Nous l'avons appliquée à l'analyse des stéroïdes de colza (figure 19).

Stéroïdes des huiles de colza, soja et tournesol

- Le β -sitostérol et le campestérol sont présents dans presque toutes les huiles végétales, le premier de ces deux stéroïdes étant largement majoritaire dans la composition centésimale.

- Le stigmastérol se rencontre surtout dans l'huile de soja qui en est l'une des principales sources naturelles et, en moindre part, dans l'huile de tournesol.

- Le brassicastérol est caractéristique du colza et plus généralement des crucifères ; on l'a signalé dans les graines de radis (145) et il existerait aussi dans le règne animal, par exemple chez le crabe (146).

- Le cholestérol. Sa présence en faible quantité dans les huiles de colza provenant de graines de variétés connues (Pégina II, Matador) a été démontrée par CAPELLA et al. (123) à l'aide de la spectrométrie de masse. L'existence du cholestérol semble assez indépendante de l'espèce végétale d'où provient l'huile, mais en relation avec l'état ou la variété de la graine considérée. Elle serait le résultat d'une biosynthèse secondaire et limitée par rapport à l'ensemble des réactions du métabolisme des phytostéroïdes.

- Un Δ 7-stérol. Le quatrième composant de la fraction stérolique de l'huile de tournesol a été caractérisé par KARLESKIND (62) comme étant un Δ 7-stérol (réaction de MOORE et BAUMAN positive). Par comparaison de Rf sur couche mince et de volumes de rétention en chromatographie en phase gazeuse, cet auteur "pense qu'il s'agit du Δ 7-stigmastérol". GRACIAN et MARTEL (147) ne partagent pas cette opinion et contestent la nature stérolique de la substance qui, à leur avis, pourrait être un alcool triterpénique récupéré avec les stéroïdes. Ils appuient leur argumentation en comparant aussi des volumes de rétention (ce qui prouve l'insuffisance d'une identification s'appuyant sur les résultats d'une seule méthode !).



Figure 19

Chromatographie en phase gazeuse des stérols de colza sous forme libre et éthérifiée

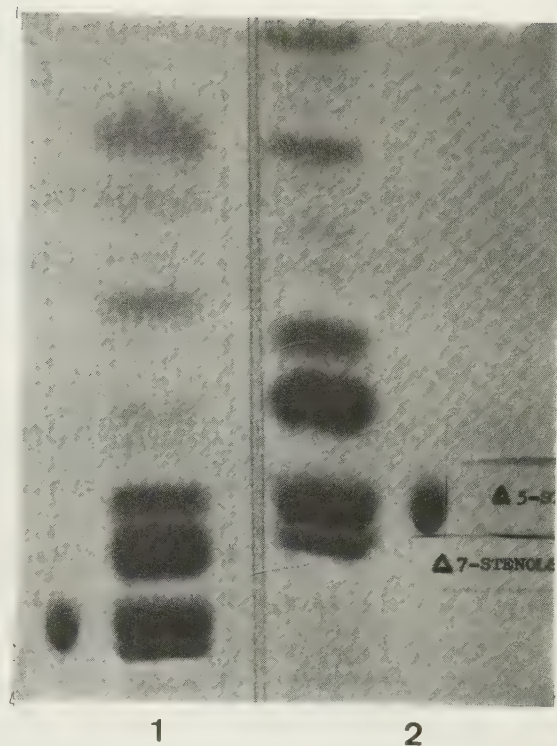


Figure 20

Chromatographie de l'insaponifiable de tournesol (développement double)

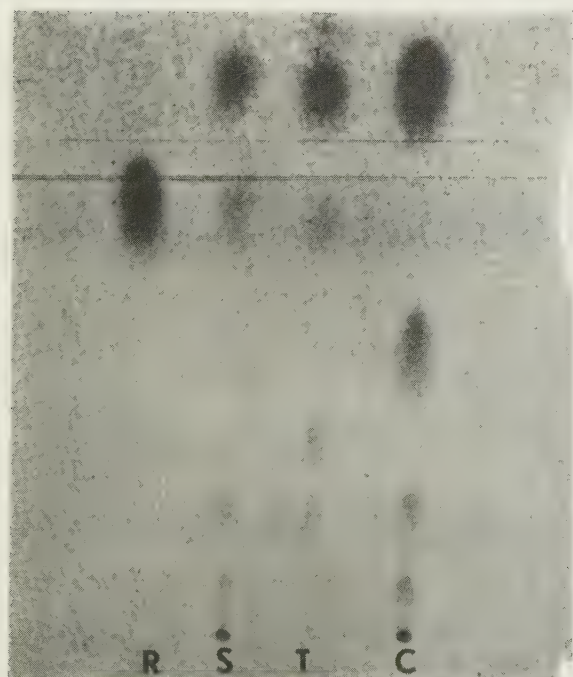


Figure 21

Chromatographie des acétates de stérols sur couche de silice G imprégnée de AgNO_3

- R. stigmastérol
- S. stérols de soja
- T. stérols de tournesol
- C. stérols de colza

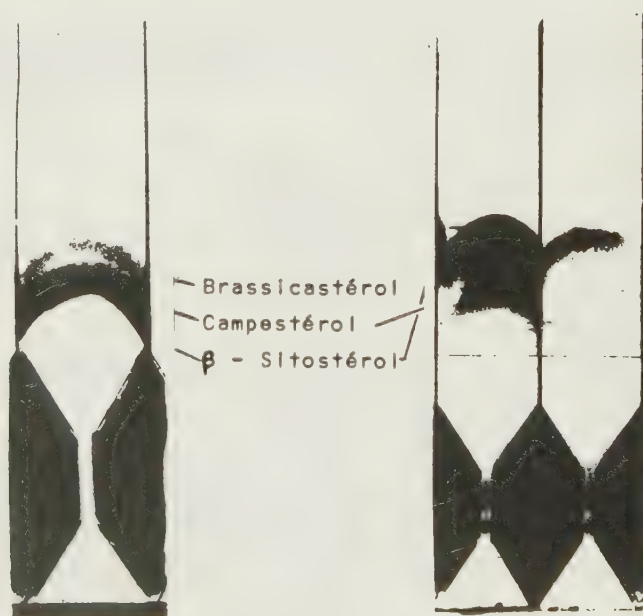


Figure 22

Chromatographie des acétates de stérols totaux de colza

- 1. sur plaque de kieselguhr G imprégnée d'undecane
- 2. sur plaque mixte d'alumine-magnésie

RESULTATS EXPERIMENTAUX

A. FRACTIONNEMENT DES STEROLS TOTAUX

1. Chromatographie sur couches minces

- Couche de silice G

Dans les conditions habituelles de chromatographie, la bande stéro-lique de l'insaponifiable de tournesol se dédouble plus ou moins complètement ($Rf_1 = 0,24$ et $Rf_2 = 0,28$) et des fractions assez pures ont été récupérées par chromatographie préparative après deux migrations successives (figure 20)

- Couche de silice G imprégnée de nitrate d'argent

Les stérols totaux sont déposés sous forme d'acétates. Contrairement à la plupart des références citées et après plusieurs essais, ce sont des plaques peu imprégnées (10 % $AgNO_3$ par rapport à la silice en poids) qui nous ont donné les meilleurs résultats.

Comme le montrent le tableau XVII et la figure 21, les $\Delta 5$ et $\Delta 7$ -sténols correspondants (le β sitostérol peut aussi s'appeler $\Delta 5$ -stigmasténol) sont séparés ainsi que des stérols diinsaturés (comme le brassicastérol et stigmastérol) dont les positions des doubles liaisons (5 et 22) ne diffèrent que par la configuration trans de l'une d'entre elles (22 trans pour le stigmastérol).

TABLEAU XVII

Rf relatifs des stérols de colza, soja et tournesol
(acétates séparés sur couche silice G+Ag NO_3)

	colza	soja	tourne-sol
$\Delta 7$ -stigmasténol	-	-	1,10
β -sitostérol	1	1	1
campestérol	1	1	1
stigmastérol	-	0,77	0,77
brassicastérol	0,52	-	-

- Couche de Kieselguhr imprégnée d'undécane et couche contenant de la magnésie

Malgré des possibilités de séparation illustrées par la figure 22, nous n'avons pas obtenu une bonne répétabilité au cours de nos essais, vraisemblablement à cause des difficultés rencontrées pour délimiter d'une façon toujours identique les zones réservées au dépôt de l'échantillon. La faible capacité de charge des plaques ne permet pas d'en faire un usage préparatif.

2. Chromatographie en phase gazeuse

Injection de dérivés. Après préparation des acétates selon (144), puis des TMS (147), ceux-ci sont injectés et, dans le cas particulier du stigmastérol, nous avons comparé les volumes de rétention de ces dérivés à ceux du stigmastérol

pur. Les résultats (Tableau XVIII) montrent que l'utilisation de dérivés augmente la durée de l'analyse mais facilite les séparations. De même, la réponse en ionisation de flamme est améliorée.

TABLEAU XVIII

Rétention relative et coefficient de réponse du stigmasterol pur et de ses dérivés

	Stigmasterol libre	Acétate	T.M.S.
Rétention relative (squalane = 1)	2,78	3,00	3,40
Coefficient de réponse (squalane = 1)	1,58	1,23	1,30

- Chromatographie des stérols totaux

Les résultats de nos déterminations sont groupés dans le tableau XIX, les stérols ayant été injectés sous forme libre. La figure 23 représente les chromatogrammes obtenus avant et après acétylation des stérols totaux de tournesol. Nous remarquons des épaulements de pics plus nets dans le deuxième cas et qui traduisent l'existence d'isomères ou de composés de structures très voisines, habituellement confondus avec des constituants que l'on considère comme définis. L'augmentation du pouvoir séparateur des colonnes montrerait vraisemblablement que ces mélanges naturels sont d'une composition complexe.

TABLEAU XIX

Composition centésimale des stérols totaux déterminée par chromatographie en phase gazeuse

Huile	Brassicastérol	Campestérol	Stigmasterol	β -Sitostérol	Δ^7 -Stigmasterol
colza	11	29	1	60	
soja	11	23	19	56	2
tournesol	11	11,5	10	62	16,5

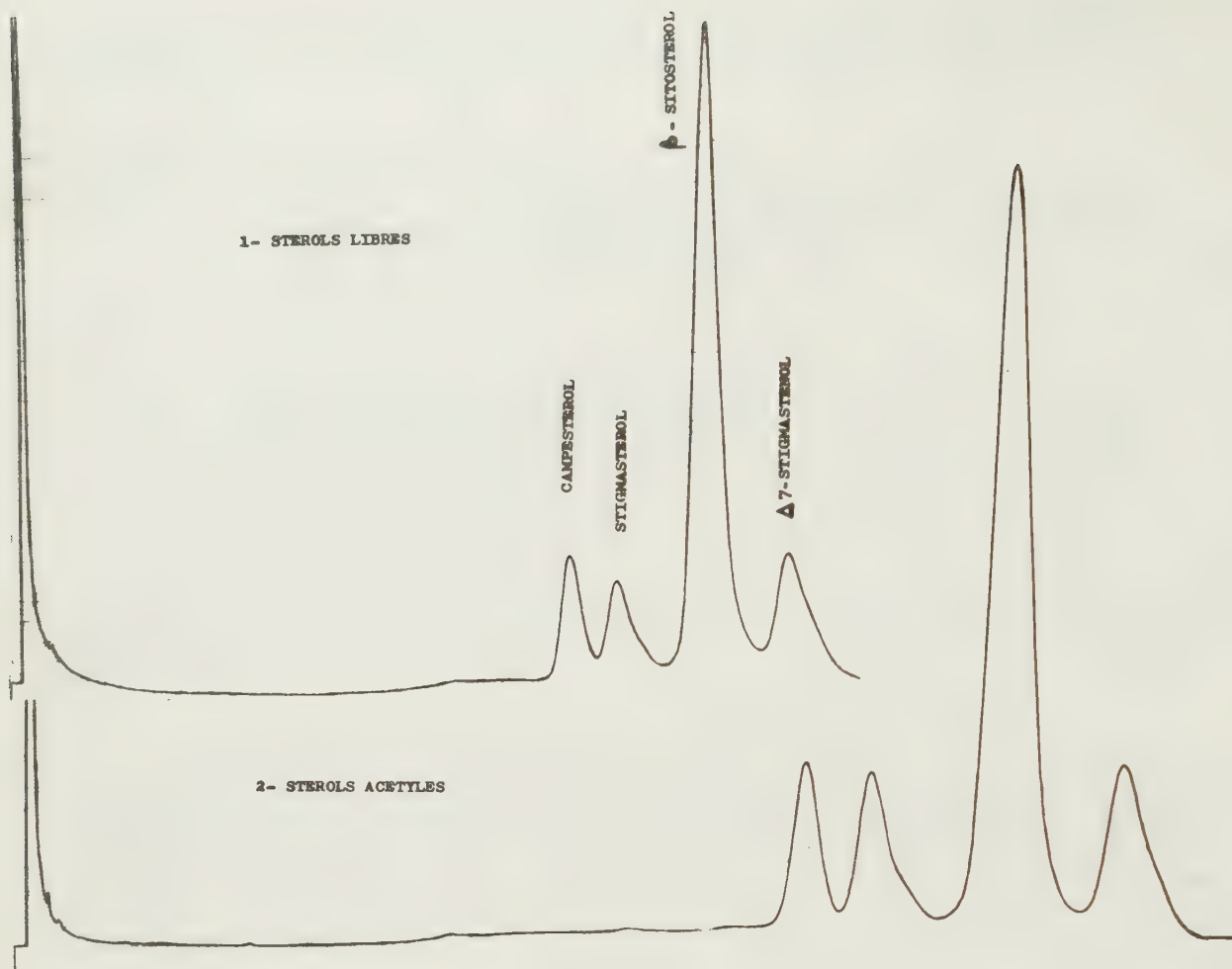


Figure 23

Chromatographie en phase gazeuse des stérols
de tournesol

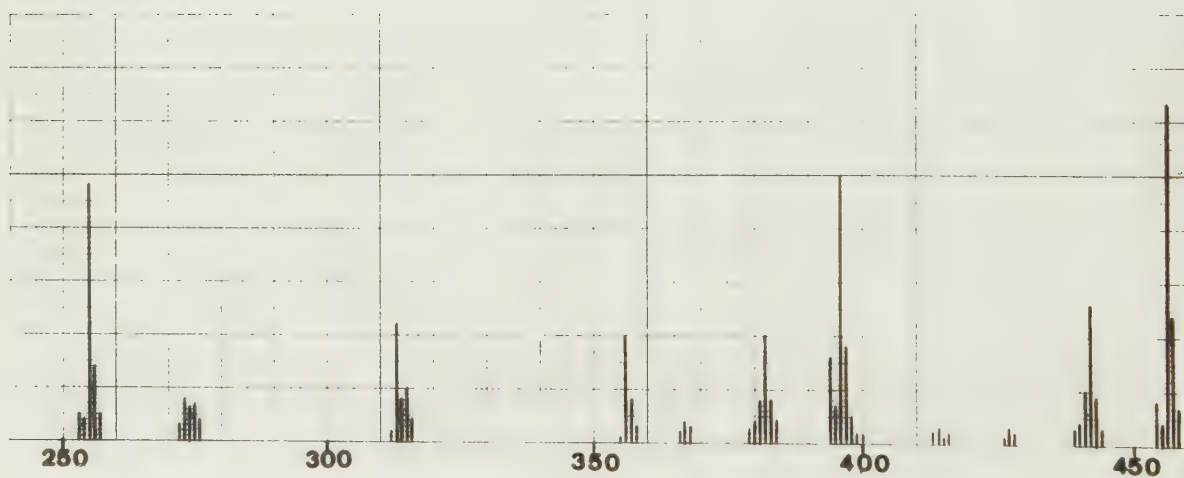


Figure 24

Spectre de masse de la fraction stérollique, $R_f = 0,24$
(acétates)

B. IDENTIFICATION DU Δ^7 -STIGMASTENOL (Ethy 24 Cholestène-7 ol 3 β) DANS LE TOURNESOL

1. Isolément du Δ^7 -sténol

Par C.C.M. avec développement multiple, nous avons dédoublé la bande stérolique de l'insaponifiable de tournesol (figure 20). Les différences de révélation signalées au chapitre II sont déjà caractéristiques de Δ^7 -sténols (148) pour la bande de Rf inférieur qui, de plus, après récupération, présente une réaction colorée bleue en moins de deux minutes avec le réactif de MOORE et BAUMAN, donc positive.

De par la position respective de la double liaison et de l'hydroxyle, on explique facilement que les Δ^7 -sténols migrent moins que les autres stérols par suite d'une plus grande polarité de l'hydroxyle.

2. Chromatographie sur couche de silice G imprégnée de nitrate d'argent (acétates)

Les stérols totaux donnent trois taches dont l'une d'entre elles peu importante est représentative d'un constituant moins retenu que l'acétate de β -sitostérol (figure 21). COPIUS PEERBOOM et al. (134), dans ce type de chromatographie, montrent que seuls les Δ^7 -sténols ou les stanols sont moins retenus que les Δ^5 -sténols correspondants.

3. Chromatographie en phase gazeuse

La fraction de Rf inférieur isolée par C.C.M. préparative est chromatographiée dans les mêmes conditions que les stérols totaux de tournesol. Il apparaît un pic principal (72% de rétention analogue à celle du pic non identifié.)

4. Microhydrogénation catalytique

La substance isolée précédemment est acétylée puis l'acétate est hydrogéné pendant trois heures en présence de charbon palladié. L'analyse par chromatographie en phase gazeuse avant et après hydrogénation permet de constater que la rétention du pic principal n'est pas modifiée. Nous démontrons indirectement que la double liaison est bien en position 7 ou que le constituant est un stanol.

5. Spectrométrie de masse *

La même fraction sous forme d'acétate a été analysée par spectrométrie de masse. Le spectre a été interprété en se basant sur les indications particulières de KNIGHT (149) et les données générales de SILVERSTEIN et al. (150)

Comme en chromatographie en phase gazeuse, nous retrouvons trois constituants (figure 24) :

(1) $m/e = 456 = M_1$ (stigmasténol)

- Un pic parent important est généralement observé lorsque la double liaison est en position 7-8

* Nous remercions vivement M. BARBIER et M. ALCAIDE de l'Institut de Chimie des Substances Naturelles (CNRS, Gif-sur-Yvette) de nous avoir permis la réalisation de cette mesure et de nous avoir aidés dans l'interprétation des spectres.

- D'autres pics correspondent aux fragmentations

$$441 = M_1 - 15 \text{ (methyl)}$$

$$396 = M_1 - 60 \text{ (acide acétique)}$$

$$381 = M_1 - 15 - 60$$

$$255 = M_1 - 60 - 141 \text{ (acide acétique + chaîne latérale)}$$

(2) $\underline{m/e = 454 = M_2}$ (stigmastérol)

$$439 = M_2 - 15$$

$$394 = M_2 - 60 \text{ etc...}$$

(3) $\underline{m/e = 442 = M_3}$ (campestérol)

$$427 = M_3 - 15$$

$$382 = M_3 - 60 \text{ etc...}$$

Etant donné la différence de constitution de ces stérols, les indications quantitatives que l'on pourrait tirer sont assez aléatoires, mais nous confirmons que le constituant principal du mélange est le stigmastérol et que la position de l'unique double liaison est en 7-8.

Le Δ^7 -stigmastérol est aussi l'un des constituants des stérols de l'huile de soja ; nous l'avons isolé par chromatographie préparative, puis identifié.

Les 4- α -methylstérols apparaissent comme étant des intermédiaires de la biosynthèse des phytostérols. De nombreux travaux, dont ceux de OURISSON et al. (151), de AEXEL et al. (152), portant sur quelques espèces végétales (tabac, ronce, carotte), ont permis de préciser le type de réaction intervenant (cyclisation, déméthylation) et la nature des composés formés. BARBIER (153) propose le schéma (figure 25) pour expliquer la biosynthèse du β sitostérol à partir du cycloarténol.

L'analyse d'insaponifiables d'huiles végétales donne des résultats qui confirment en partie un tel enchaînement car, à côté du β -sitostérol constituant majoritaire de la fraction stérolique de la plupart des huiles, dans de nombreux cas, les deux alcools terpéniques précurseurs (cycloarténol, 24-méthylène cycloartanol) ont été identifiés (28). La faible différence de polarité entre stérols et 4-methylstérols et les difficultés de séparation en découlant expliquent pourquoi ces derniers composés n'ont été étudiés qu'assez récemment. WEIZMANN et MAZUR, en 1958 (154), signalèrent la présence de citrostadiénol dans l'huile de zeste de pamplemousse. Peu après, KUKSIS et al. (155) appliquent sur colonne de silice l'insaponifiable d'une huile de germe de maïs et obtiennent une fraction qui est reconnue être un mélange d'alcools et de 4-methylstérols. A notre connaissance, dans le domaine des huiles alimentaires, il n'y a pas eu d'autre information à ce sujet et, cependant, il est permis de penser que de telles huiles renferment ces composés.

Isolément de methylstérols à partir des insaponifiables d'huile de colza et tournesol

La chromatographie sur colonne de silice de l'insaponifiable de colza nous a permis de recueillir une collection de fractions qui sont analysées ensuite sur couche mince. Il apparaît que les stérols sont immédiatement précédés de constituants légèrement moins polaires mais réagissant de façon identique avec le révélateur. MUCAM (156) indique que, sur plaque de silice G développée à l'aide d'un mélange cyclohexane-acétate d'éthyle (85:15), on sépare dans l'ordre : stérols, 4-methylstérols, alcools triterpéniques. Dans ce système, la fraction que nous avons isolée présente un R_f différent des alcools terpéniques, aliphatiques et des stérols mais, chromatographiquement, se situe néanmoins entre ces deux derniers types de constituants.

L'insaponifiable de l'huile de tournesol a été déposé sur plaque de silice G, puis soumis à quatre développements successifs avec un mélange éluant de faible polarité. Comme le montre la plaque (figure 26), dans ces conditions, les alcools se groupent en une seule bande et se trouvent séparés des stérols par des constituants ayant un R_f identique à la fraction précédemment recueillie. La chromatographie a été répétée préparativement.

Caractérisation des methylstérols

1. Réaction de Liebermann-Buchard

De même que les stérols, la fraction "methylstérols" donne à ce test une coloration verte mais qui se développe très rapidement (figure 27). C'est une caractéristique des stérols ayant une double liaison en position 7-8 et qui sont dits "fast-acting". Il est intéressant de remarquer que NORCIA (157) mentionne la présence de tels composés, surtout dans les huiles de germe sans en trouver l'exacte nature. Les methylstérols présentent aussi cette particularité dans leur structure.

2. Chromatographie sur couche mince

La chromatographie analytique sur plaque de silice d'un étalon, le citrostadiénol, et des methylstérols des deux huiles donne trois taches de R_f identique, et le mélange de l'étalon avec l'un ou l'autre des produits donne toujours une seule tache, même en modifiant les conditions de développement. Ceci confirme à nouveau que ces produits sont bien des 4-methylstérols.

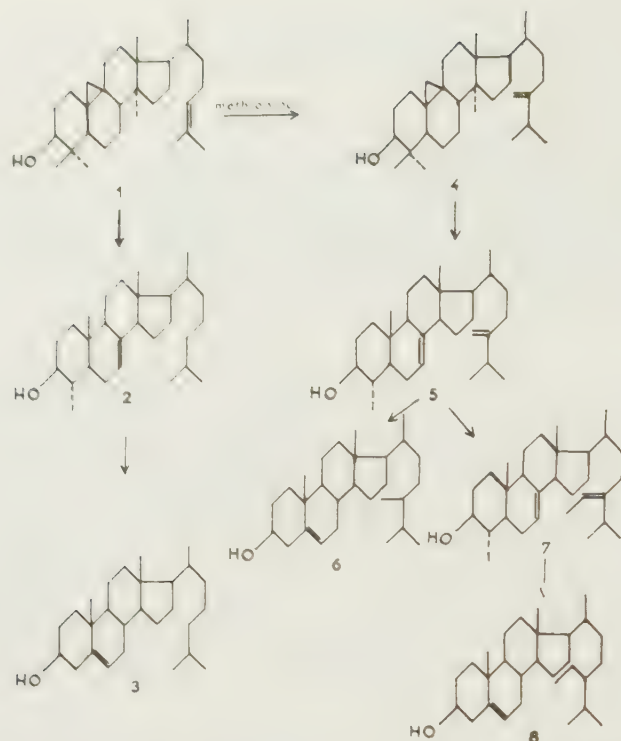


Figure 25

Biosynthèse de quelques stérols à partir du cycloarténol
selon BARBIER (166)

- | | |
|------------------------------|---------------------------|
| 1. cycloarténol | 5. 24-méthylène lophénol |
| 2. lophénol | 6. campestérol |
| 3. cholestérol | 7. 24-éthylidène lophénol |
| 4. 24-méthylène cycloartanol | 8. β -sitostérol |

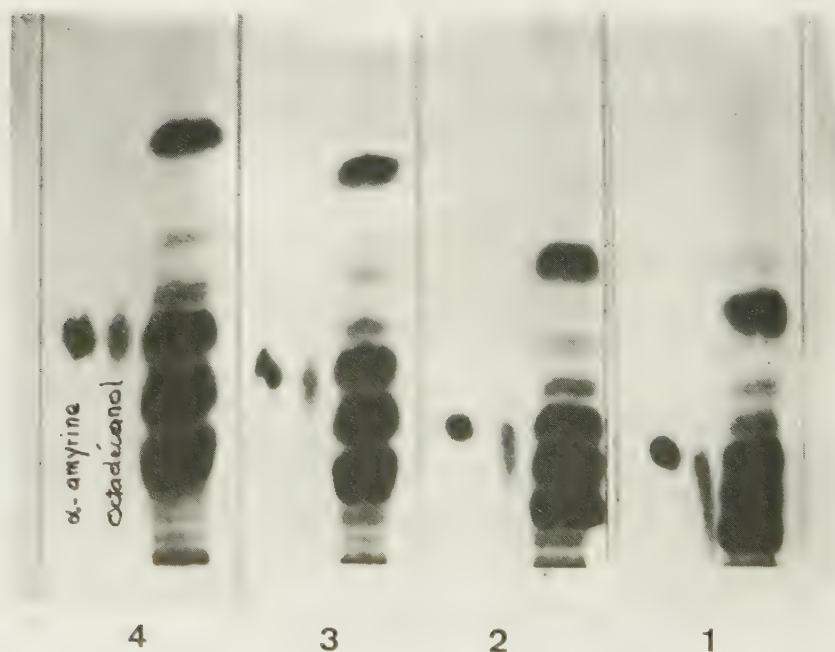


Figure 26

C.C.M. de l'insaponifiable de tournesol (Développement multiple)

3. Chromatographie en phase gazeuse

La chromatographie en phase gazeuse des méthylstéroïls de colza, effectuée dans les mêmes conditions que celle des stéroïls, permet de distinguer principalement 4 pics (figure 28). L'identification de l'un d'entre eux a été possible grâce au citrostadiénol de référence dont nous disposions. Le pic 4 et l'étalon ont la même distance de rétention, la chromatographie étant réalisée d'abord sur colonne imprégnée de SE 30 puis, ensuite, sur colonne à 3 % OV1.

La chromatographie des méthylstéroïls de deux autres huiles (tournesol, soja) montre que les mêmes constituants sont présents mais en proportions différentes :

TABLEAU XX

4 α méthylstéroïls des huiles de colza, tournesol et soja

Constituants	1	2	3	4 citraostadiénol
Distances de rétention relatives à 4	0,68	0,76	0,91	1
Colza %	23	46	non calc.	31
Tournesol %	28	22,5	-	49,5
Soja %	14,5	30	-	55,5

4. Spectrométrie de masse des méthylstéroïls de colza

Ils sont analysés sous forme libre. La chromatographie en phase gazeuse a montré que le mélange contient au moins 4 constituants, dont l'un a été identifié comme étant le citrostadiénol. Le schéma de biosynthèse peut permettre de penser que le méthylène-lophénol et le lophénol (methyl-4 α (5 α) cholestène-7 α -3 β) sont présents.

Citrostadiénol	$C_{30}H_{50}O$	M = 426
Méthylène lophénol	$C_{29}H_{48}O$	M = 412
Lophénol	$C_{28}H_{46}O$	M = 400

Les pics observés sur le spectre sont les suivants (figure 29) :

m/e	M-15	M-18	M-15-18	M-chaîne latérale + 2H ⁺
426	411	408	393	285
412	397	394	379	"
400	385 (faible)	382	357 (très faible)	"

Une coupure de la chaîne latérale au niveau de l'atome de carbone 20 donne un pic à 328 = M-(fragmentation $C_{20}+2H^+$)

Quantitativement, les proportions seraient les suivantes : citrostadiénol 44 %, 24-méthylène-lophénol 46 %, lophénol 5 %, sans tenir compte du quatrième constituant non identifié.

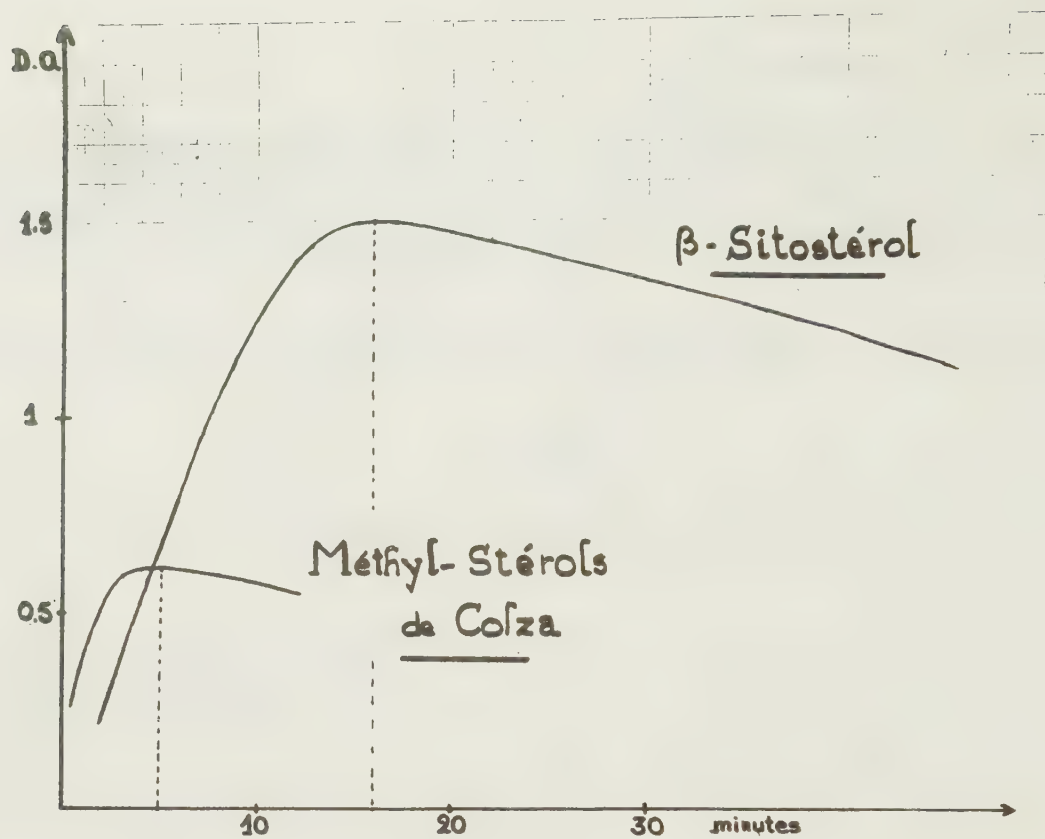


Figure 27

Cinétique de la réaction de Liebermann-Buchard

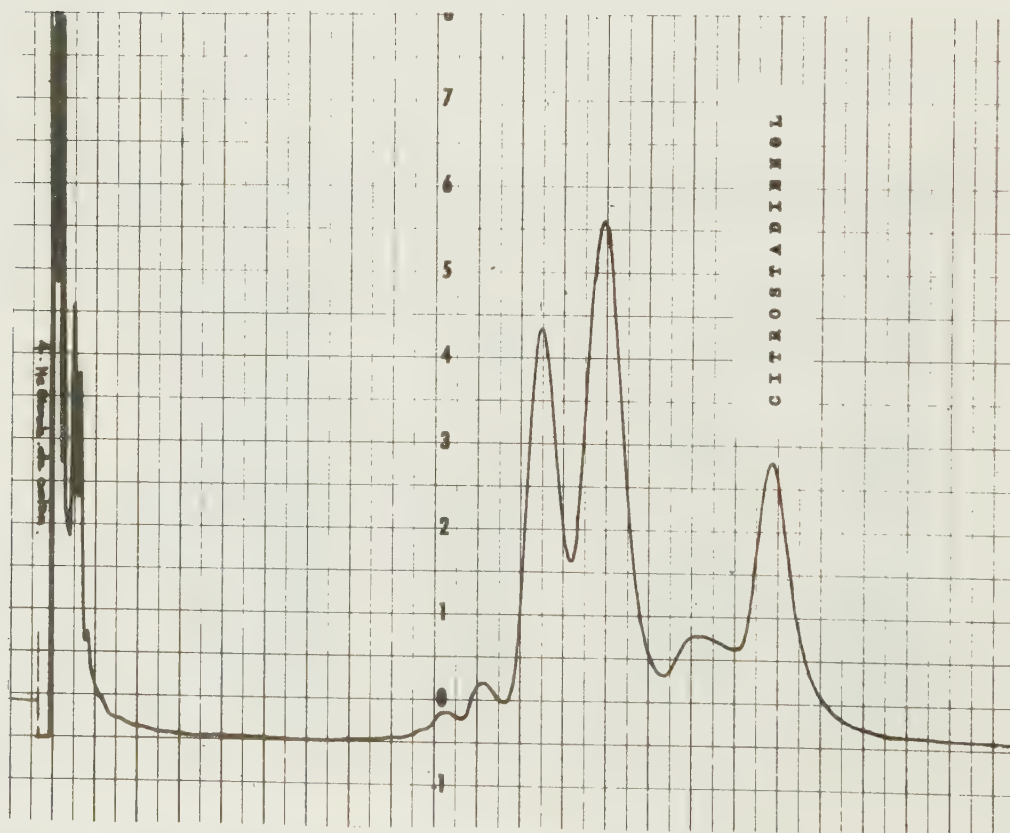


Figure 28

Chromatographie en phase gazeuse des méthylstérols de colza

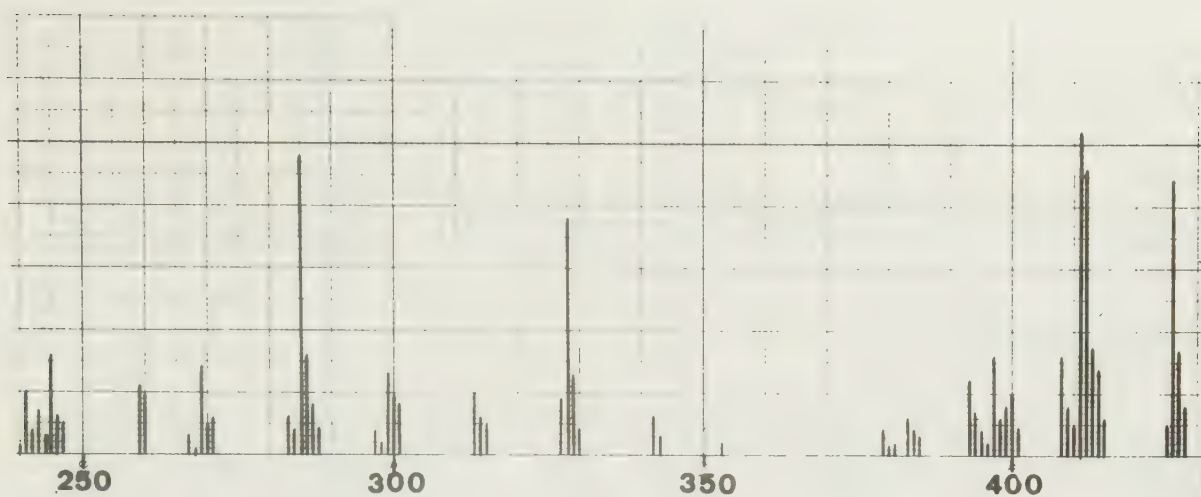


Figure 29

Spectrométrie de masse des méthylstérois de colza

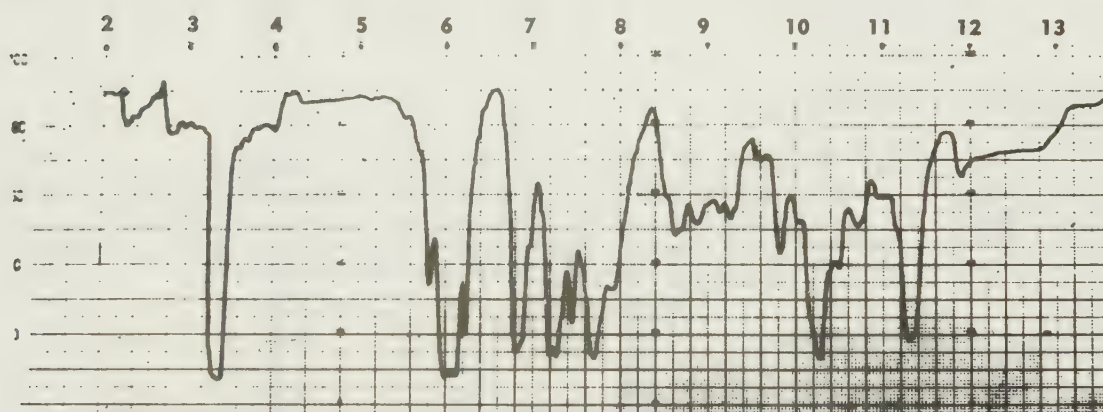


Figure 30

Spectre infrarouge de la fraction cétonique de l'insaponifiable de colza

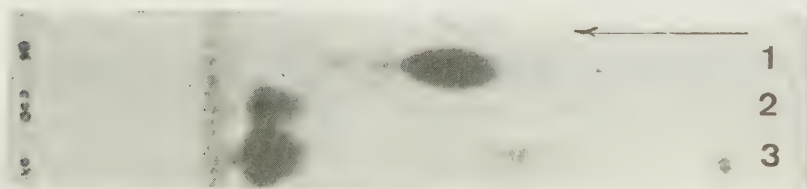


Figure 31

Microréactions d'analyse fonctionnelle contrôlées
par C.C.M.

- 1, alcools triterpéniques de lin
- 2, cétones terpéniques de colza
- 3, oxydation des alcools triterpéniques de lin

Par chromatographie analytique de l'insaponifiable, sur couche de silice G développée par le système hexane-oxyde d'éthyle (1:1), nous avons mis en évidence une bande (n° 9) de $R_f = 0,73$, représentative de constituants seulement rencontrés dans l'insaponifiable de colza.

Réactions colorées

Diverses colorations sont observées après pulvérisation des plaques à l'aide de réactifs tels que l'acide sulfurique 1/2 concentré (col. jaune-orangée), le pentachlorure d'antimoine (col. bleu - grise), l'aldéhyde anisique (col. jaune). Le test à la dinitrophenylhydrazine est instantanément positif. Les travaux de HUNECK (158), ceux de MURAKAMI et al. (159) sur l'identification par chromatographie en couche mince de triterpènes tetra et pentacycliques permettent d'avancer que les constituants responsables de ces différentes réactions sont du type "cétones terpéniques".

Une cétone triterpénique, la friedéline (friedo-oléonan-3-one) $C_{30}H_{50}O$ a été identifiée par MAC LEAN et al. (160) dans l'insaponifiable de l'huile de graine de marron d'Inde.

Isolement de cette fraction

La chromatographie sur colonne d'alumine (cf. 2ème partie) de l'insaponifiable de colza permet de récupérer plusieurs milligrammes d'une substance peu polaire, impure, d'odeur agréable, qui est ensuite rechromatographiée sur plaque préparative de silice G. Nous avons pu isoler une matière cristalline, légèrement jaune en quantité suffisante pour effectuer quelques déterminations.

Spectrophotométrie infrarouge

Le spectre réalisé à partir d'une solution dans le tétrachlorure de carbone confirme la présence de groupements cétoniques par de fortes bandes d'absorption entre 5,80 et 6,24 μ (figure 30).

Microréactions contrôlées par C.C.M.

Selon la technique décrite par MATHIS (161), nous avons effectué une microréduction par le borohydrure de sodium et une microoxydation des alcools triterpéniques de lin par l'anhydride chromique. Nous avons opéré en tube capillaire ou sur la plaque elle-même, le résultat de ces opérations étant contrôlé ensuite par chromatographie analytique sur couche mince.

- L'oxydation des alcools triterpéniques donne une tache principale de même R_f que la substance inconnue et présentant toutes les réactions colorées précédemment signalées (figure 31). Cet essai confirme la nature cétonique et triterpénique de cette substance.

- La réduction de la fraction isolée se traduit par une tache de R_f intermédiaire entre alcools et cétones, colorée en bleu-outremer par pulvérisation d'acide sulfurique. Nous avons parfois observé une tache beaucoup moins intense de R_f identique à celui des alcools triterpéniques. Pour une raison non élucidée, la réaction semble se décomposer en deux temps.



Figure 32

Chromatographie en phase gazeuse

1. cétones terpéniques
2. alcools triterpéniques de lin
3. produits d'oxydation des alcools triterpéniques de lin

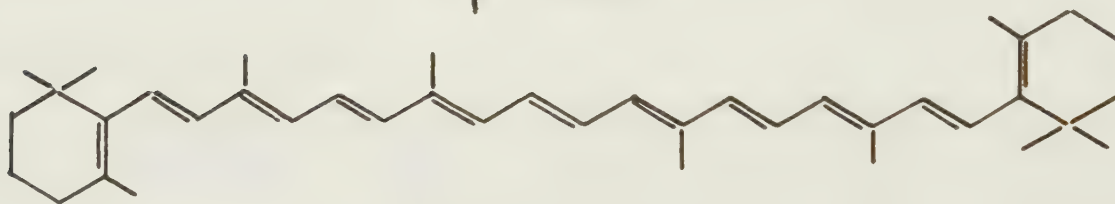
Chromatographie sur couche d'alumine G

En nous inspirant des travaux de IKAN (162), nous avons constaté que la chromatographie sur couche mince d'alumine G, avec comme terme de comparaison l' α -amyrine, donne pour cette substance un R_{α} -amyrine = 2,6, valeur voisine de celle obtenue par cet auteur dans les mêmes conditions pour la cycloarténone.

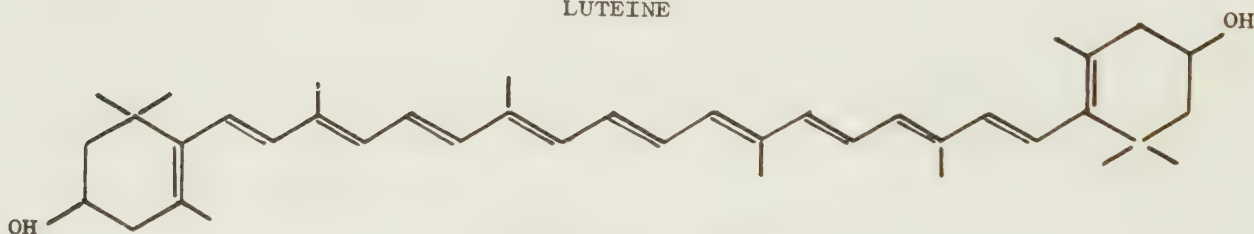
Chromatographie en phase gazeuse

La chromatographie en phase gazeuse de la fraction isolée montre qu'il s'agit d'un mélange avec un constituant principal (93 %) et des constituants mineurs dont certains plus légers (élus peu après le solvant) pourraient correspondre à des cétones de poids moléculaires inférieurs (diterpéniques) (figure 32). Dans les mêmes conditions, nous avons d'une part chromatographié les alcools triterpéniques de lin, d'autre part leurs produits d'oxydation. Nous confirmons par cette méthode que le constituant principal est bien la cycloarténone.

β - CAROTENE



LUTEÏNE



CHLOROPHYLLE A

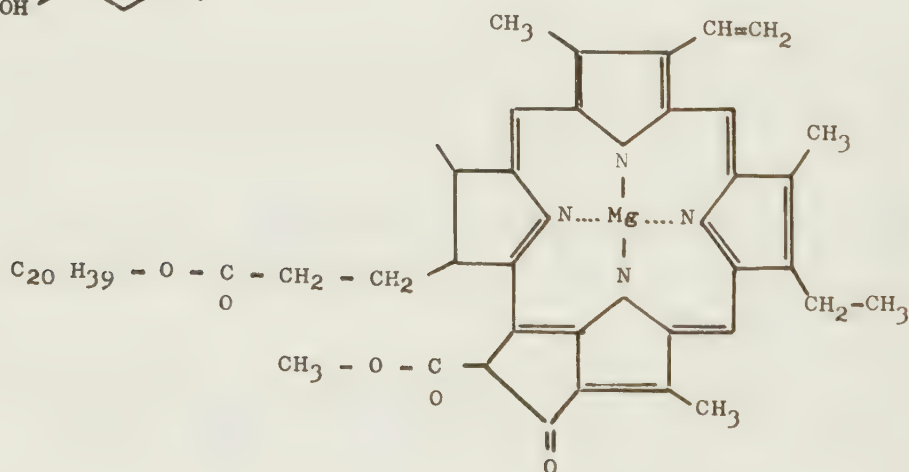


Figure 33

Structure de quelques pigments végétaux

Généralités

Les pigments sont responsables de la coloration des huiles végétales. Ils existent dans l'huile en très faibles quantités et sont particulièrement sensibles à l'oxydation. Leurs produits de dégradation communiquent à l'huile un aspect défavorable et, pour éviter cet inconvénient, les pigments sont éliminés en majeure partie au cours du raffinage (décoloration). L'obtention d'une huile de couleur convenable implique une bonne connaissance qualitative et quantitative de ces constituants qui appartiennent principalement à deux types :

Les caroténoïdes, de couleur rouge, orangée ou jaune, sont des tétra-terpènes de configuration linéaire ou cyclique. Ils se subdivisent en deux groupes :

- Les carotènes, dont le représentant le plus connu est le β -carotène, appartiennent à la famille des hydrocarbures. Leur coloration diminue de pair avec le nombre de doubles liaisons conjuguées (phytoène incolore car seulement trois doubles liaisons conjuguées).

- Les xanthophylles comportent un ou plusieurs atomes d'oxygène dans leur molécule engagés sous diverses formes (hydroxyl, céto, époxy, etc...). La lutéïne par exemple possède deux groupements hydroxyle.

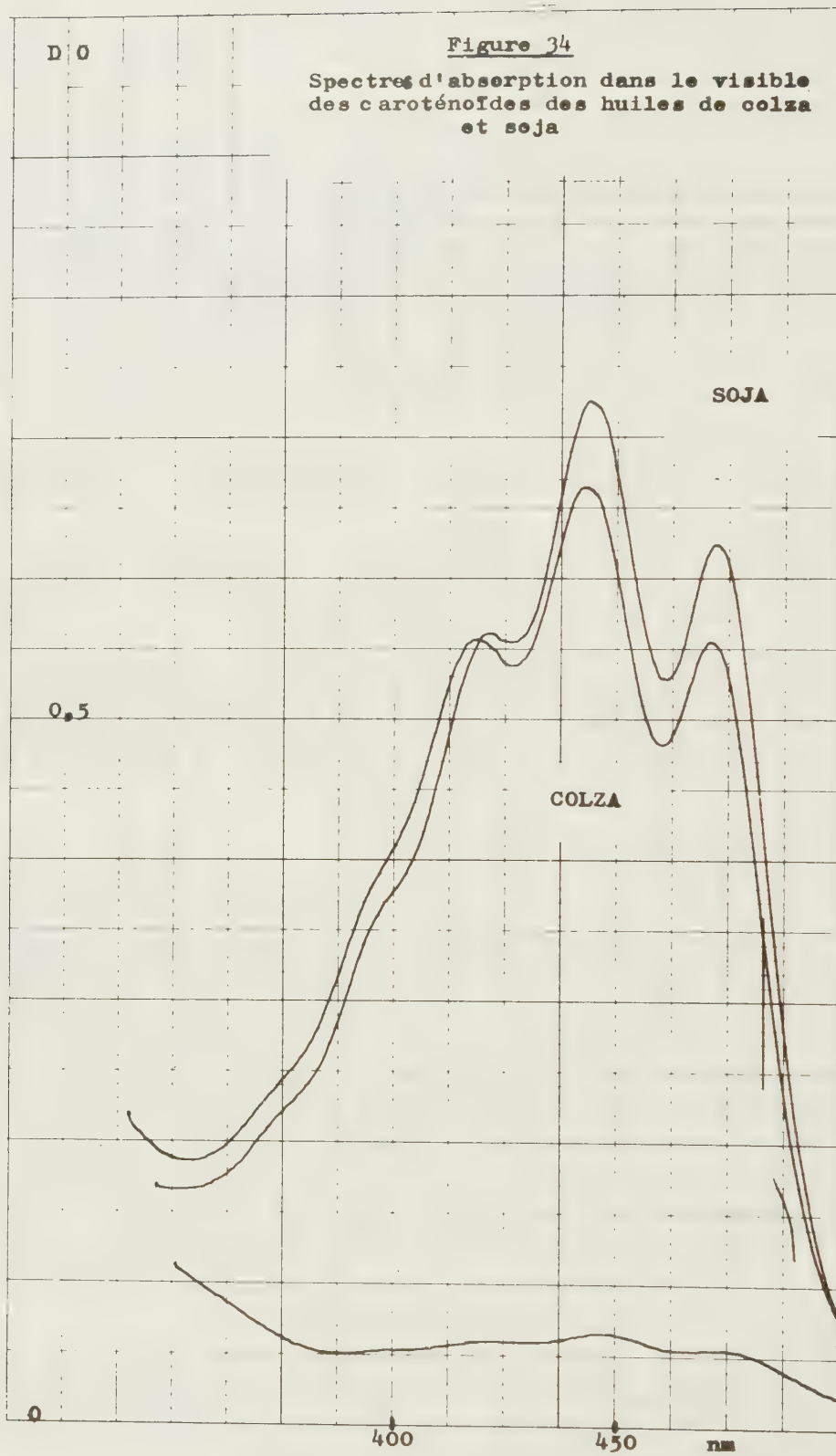
Les chlorophylles, vertes, interviennent dans le processus de la photosynthèse et se présentent sous deux formes (a et b), dont la dégradation conduit aux pheophytines correspondantes. Chimiquement, la chlorophylle est un édifice tétrapyrrolique avec un atome de magnésium en son centre et latéralement deux fonctions acides estérifiées respectivement par le méthanol et le phytol.

Analyse des pigments dans les huiles végétales

Une importante contribution à la connaissance des pigments caroténoïdes naturels a été apportée par les travaux de KARRER et JUCKER (163), ainsi que par de nombreuses autres études, parmi lesquelles nous citerons récemment celle de DAVIES (164) surtout relative à leur analyse. Les difficultés rencontrées tiennent à la fois aux faibles teneurs de pigments dans le corps gras et à leur instabilité en présence de la plupart des agents chimiques. SROUR (165) a repris puis comparé quelques méthodes habituellement recommandées pour l'extraction, le fractionnement, l'identification et le dosage des principaux pigments existant dans les huiles végétales. Les techniques adoptées dépendront de la nature du composé analysé, de sa teneur, de sa fragilité. Les chlorophylles, si elles sont suffisamment abondantes, sont dosées et identifiées sur l'huile elle-même, alors que les caroténoïdes peuvent être concentrés et séparés de différentes façons (insaponifiable, chromatographie sur colonne, extraction liquide-liquide) avant d'être évalués. Le dosage lui-même est basé sur les résultats de mesures spectrophotométriques après étalonnage, alors que l'identification de chaque constituant repose sur la détermination d'absorptions caractéristiques dans le domaine visible, ultraviolet ou sur la mesure des R_f en chromatographie sur couche mince.

Les pigments des huiles de colza, soja et tournesol

Les premières données sont relatives à l'analyse d'une huile de soja, qui selon DURKEE (166) renfermerait 19 ppm de carotène. Le contenu en chlorophylle (1,5 ppm) sera déterminé par la suite. SCHOLFIELD et DUTTON (167) préciseront que la plus grande partie des caroténoïdes de cette huile sont polaires (xanthophylles). Des déterminations analogues seront entreprises sur l'huile de colza par KAUFMANN (19) puis MINGOT (168), lequel tente d'identifier l'un des pigments jaunes. Mais les travaux les plus originaux sont ceux de NIEWIADOMSKI (169) qui dose d'une part les caroténoïdes totaux (4,3 à 7 ppm) et d'autre part les chlorophylles et pheophytines après avoir mis au point une méthode basée sur la détermination des absorptions à quatre longueurs d'onde et l'utilisation de coefficients appropriés pour le calcul. L'huile de colza ne contiendrait pas de chlorophylle A mais la



pheophytine correspondante (18 à 25 ppm), ainsi que la chlorophylle et la pheophytine B (0 à 1,8 et 0,5 à 6,2 ppm).

Il faut noter d'importantes divergences en ce qui concerne les teneurs en caroténoïdes totaux signalées par différents auteurs. Dans les huiles brutes de colza et de soja, BOX et BOCKENOOGEN (170) trouvent respectivement 33 et 35 ppm. PAQUOT (171) indique 50 ppm pour le colza, alors que BENK et BRIXIUS (172) ne donnent que 3 et 1,7 ppm. Seuls les traitements que subissent les pigments avant leur dosage permettent d'expliquer de telles différences.

L'huile de tournesol, beaucoup moins riche (0,60 ppm de caroténoïdes) n'a été que peu étudiée sous ce jour (26) (184). MOKHNACHEZ et al. (173) ont décrit une méthode de détermination rapide du carotène de cette huile après concentration, par densitométrie sur papier.

Dosage des caroténoïdes totaux et des chlorophylles

1. Caroténoïdes

Les huiles brutes filtrées (soja, colza) ou l'insaponifiable (tournesol) sont mis en solution dans l'hexane puis examinés par spectrophotométrie dans le visible. Pour l'huile de tournesol, l'insaponifiable a été préparé à froid et sous azote (34). Conventionnellement, les teneurs en caroténoïdes totaux sont exprimées en β -carotène. Les valeurs trouvées figurent dans le Tableau XXII (page 73).

2. Chlorophylles

L'existence dans l'huile des deux chlorophylles A et B et de leurs produits de dégradation, les pheophytines, nous a fait adopter les formules de calcul proposées par NIEWIADOMSKI et al. (169) rendant compte de ces 4 formes. L'huile de tournesol, pauvre en chlorophylles, a été examinée en cuve de forte épaisseur comme le recommande DAGHETTA et al. (174). Le tableau XXI résume les résultats de nos déterminations et calculs. Il apparaît que, dans les trois cas, la forme la plus abondante est la pheophytine A, malgré des teneurs totales très différentes.

TABLEAU XXI

Chlorophylles

Huile	Teneurs en chlorophylle et pheophytine (en ppm)				
	Chl. A	Chl. B	Pheo. A	Pheo. B	Total
Colza	1,40	0	8,7	3,3	13,4
Soja	0,10	0,70	1,38	0,37	2,55
Tournesol	0	0,068	0,15	0,1	0,32

Fractionnement chromatographique des pigments

Etant donné la fragilité de ces substances, le fractionnement de leur mélange ne pourra être réalisé dans de bonnes conditions que par des techniques particulièrement adaptées (extraction liquide-liquide, chromatographie). La chromatographie sur colonne est très souvent utilisée et, parmi les adsorbants proposés, il faut citer le sucrose fixant les chlorophylles sans les dégrader (171) et la magnésiale (175) retenant les xanthophylles sans isomériser les carotènes qui la traversent.

D 0

Figure 35

Spectres d'absorption dans le visible
des chlorophylles

- 1. colza
- 2. soja
- 3. tournesol

0,5

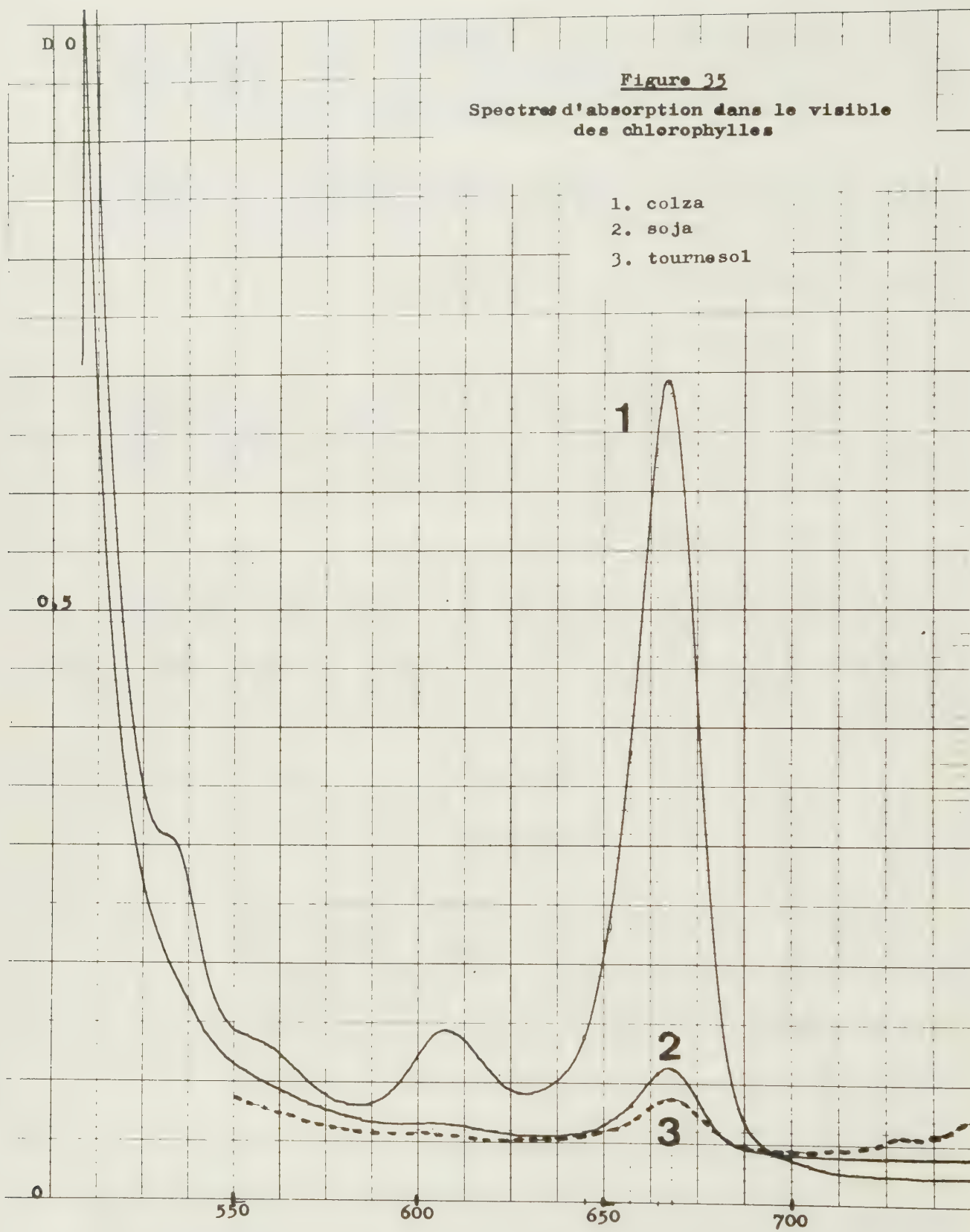
0

550

600

650

700



1. Chromatographie sur colonne mixte sucrose-magnésie

Les huiles de colza et soja en solution à 10 % dans l'éther de pétrole sont appliquées à une colonne mixte dont le cylindre d'adsorbant peut facilement être dégagé après la chromatographie. L'examen sous lumière ultraviolette fait apparaître une zone fluorescente dans la partie inférieure du sucrose (chlorophylles), alors que la partie supérieure de la magnésie contient les caroténoïdes polaires. Des zones sont délimitées, extraites, puis examinées par spectrophotométrie, ainsi que les éluats. Pour les chlorophylles, seule la teneur totale de l'huile de colza a pu être déterminée par cette méthode (8,5 ppm). Les extraits caroténoïdiques ont été dilués (hexane, alcool) puis, après spectrophotométrie, la teneur de chaque fraction est calculée (Tableau XXII).

2. Chromatographie sur colonne de magnésie-hyflosupercel (1 : 1)

L'insaponifiable de l'huile de tournesol est fractionné sur cette colonne. La fraction hydrocarbure est éluee par de l'hexane, la colonne est ensuite lavée par ce solvant. La magnésie traitée par l'alcool éthylique donne un extrait incolore, ce qui indiquerait que, dans l'huile de tournesol, les caroténoïdes sont surtout de type hydrocarbure.

TABLEAU XXII

Caroténoïdes

Huile	Teneur en caroténoïdes (en ppm)		
	Totaux	Hydrocarbures	Hydroxyles
Colza	51	4,8	44
Soja	48	5,2	39
Tournesol	1,1	1	non calc.

Identification des pigments

Deux méthodes ont été utilisées pour identifier les pigments en mélange ou après séparation chromatographique.

1. Spectrophotométrie dans le visible

Les longueurs d'onde des absorptions dans le visible des huiles pures ou en solution sont caractéristiques des pigments qu'elles contiennent, ceci pour un solvant donné. Dans le cas d'un mélange de composés de structures voisines, les déplacements en longueur d'onde sont parfois trop peu marqués pour que l'on puisse identifier correctement les constituants. Le fractionnement devient alors nécessaire. A partir du spectre visible, plusieurs déductions seront avancées. Les principaux pics ont été repérés :

colza	417	444	472	608	668
soja	421	444	472	608	668
tourneol	421		470		668

Après chromatographie sur colonne des caroténoïdes de colza et soja, la fraction polaire présente un pic à 472 plus important que dans le mélange initial. Il correspond à la lutéïne ou à l'isolutéïne (418 - 442 - 471)(163) déjà signalées. Pour le tournesol, qui renferme principalement des carotènes, le constituant responsable pourrait être le β -carotène (420 - 445 - 475 nm) ou son époxyde (442 - 471 nm).

2. Chromatographie sur plaque

L'utilisation de plaques de silice G ou d'un mélange chaux + silice G (6 + 1) permet de séparer d'une part les caroténoïdes hydroxylés ; d'autre part, les hydrocarbures.

Nous donnons dans le Tableau XXIII, pour ces deux systèmes chromatographiques, les R_f de quelques caroténoïdes (164).

TABLEAU XXIII.
R_f de quelques caroténoïdes
selon DAVIES (164),

Pigments	Systèmes chromatographiques	
	1 Silice G acétate d'éthyle- chlorure de méthylène (20 : 80)	2 Chaux + silice (6 + 1) éther de pétrole (30-70°) + 2 % benzène
phytoène	1	1
α carotène	1	0,88
β carotène	1	0,84
γ carotène	1	0,40 - 0,50
lycopène	1	0,10 - 0,20
canthaxanthine	0,90	
cryptoxanthine	0,75	
lutéine	0,35	
zéaxanthine	0,24	
violaxanthine	0,21	

Pour les insaponifiables d'huiles de soja et colza chromatographiés dans le système 1, nous avons obtenu dans chaque cas une tache peu intense à hauteur du front (carotènes), une forte tache de R_f = 0,34 et une autre plus faible de R_f = 0,25. A côté de carotènes, ces huiles contiendraient donc surtout de la lutéine et un peu de zéaxanthine. Dans le système 2, avec pour étalon le β carotène, on retrouve ce carotène seulement dans le colza, ainsi que de faibles quantités d'un composé plus polaire de R_f = 0,38, qui est le pigment principal de l'huile de tournesol. Il pourrait s'agir du γ carotène ou d'un carotène époxydé (α carotène 5-6 époxydé) peu polaire. Dans le soja, une tache de R_f = 0,21 correspond au lycopène.

Par ces deux méthodes d'identification, nous pouvons préciser, par ordre d'importance, la nature des caroténoïdes contenus dans ces huiles :

colza lutéine, zéaxanthine, β carotène
soja lutéine, zéaxanthine, lycopène
tournesol α carotène époxydé ou γ-carotène ?

Dans les huiles végétales, les tocophérols sont des constituants non glycéridiques importants car ils possèdent deux propriétés remarquables: d'une part, ils ont un pouvoir vitaminique, reconnu en premier par EVANS et al. (176), ces auteurs ayant isolé à partir d'un extrait de germe de blé une vitamine E, liposoluble, qui est un mélange de deux tocophérols (variété α et β); d'autre part, en raison de leur constitution chimique, ce sont des antioxydants naturels dont la présence dans le corps gras améliore la durée de conservation. Etant donné la fragilité de ces composés, il est souhaitable de les ménager au cours des divers stades de l'élaboration et du raffinage de l'huile. Comme le rappelle NAUDET (109), les pertes les plus sensibles sont enregistrées lors de la désodorisation. Ces propriétés expliquent la valeur commerciale s'attachant aux tocophérols en tant que sous produits de l'huilerie. Après récupération, ils peuvent être destinés à des usages pharmaceutiques, servir à équilibrer des aliments pour le bétail (177) ou permettre la stabilisation de corps gras qui en sont pauvres ou dépourvus (178).

Nous rappelons d'abord la structure des tocophérols et leurs propriétés chimiques trouvant application dans l'analyse; ensuite, nous examinons les caractéristiques des principales méthodes d'identification et de dosage. Nous avons mis au point un dosage des tocophérols libres totaux contenus dans les huiles brutes. Il a l'avantage de faire apparaître l'importance du phénomène de polymérisation de ces composés. Les tocophérols individuels sont identifiés puis dosés après fractionnement de l'insaponifiable sur plaque. A l'aide d'un exemple, nous suggérons les possibilités d'application de la chromatographie en phase gazeuse des tocophérols à la détection de certains mélanges d'huiles.

PRINCIPALES PROPRIETES DES TOCOPHEROLS ET DES PRODUITS APPARENTES

1. Structure chimique

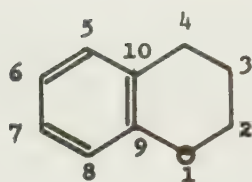
- Les tocophérols dérivent chimiquement du noyau benzodihydropyrane ou chromane sur lequel le carbone 6 porte un groupement hydroxyl (6-chromanol), alors que la position 2 se trouve liée à un groupement méthyl et une chaîne R. Celle-ci est de nature isoprénique comportant 16 atomes de carbone; elle a longtemps été considérée comme étant saturée. GREEN et al. en 1959 (179) montrèrent l'existence de deux composés analogues aux α et β tocophérols, mais dont la chaîne latérale est triénique. Par substitution des positions libres du noyau aromatique avec des groupements méthyl, deux séries de sept possibilités peuvent être envisagées englobant les huit combinaisons naturelles prédominantes. La Commission de Nomenclature biologique de l'IUPAC en 1965 (180) a dénommé les deux séries: tocophérols et tocotriénols, (Tableau XIV). Ce sont principalement les travaux de PENNOCK HEMMING et KERR en 1964 (181) qui mirent en évidence l'existence des tocotriénols dans les huiles de son de riz et de palme.

- Les plastochromanols sont des constituants d'une structure voisine de celle des tocophérols et qui sont souvent confondus avec le γ -tocophérol. Seule leur chaîne latérale (R) est plus longue et généralement comporte huit unités isopréniques (PC-8). DUNPHY et al. (182) en signalent l'existence dans l'huile de colza sans les identifier. JANICKI et al. (183) les dénommèrent substances X dans le soja, colza et lin. LEERBECK et al. (184) identifient le plastochromanol 8 dans l'huile de lin dans laquelle ils représentent 29 % des tocophérols totaux.

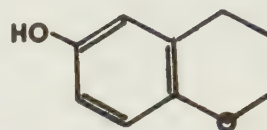
2. Polymérisation des tocophérols

Sous l'influence d'agents extérieurs ou même spontanément dans le milieu les renfermant, les tocophérols peuvent se transformer en polymères. SHONE (185) signale dans l'huile de bois de Chine un dérivé du γ -tocophérol, de plus faible polarité que ce dernier, mais portant encore un groupement hydroxyl. Il constate qu'un

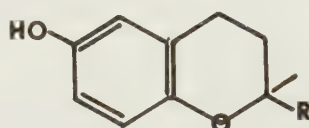
STRUCTURE CHIMIQUE DES TOCOPHEROLS ET PRODUITS APPARENTES



Chromane

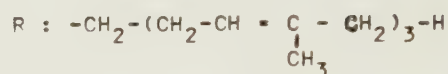
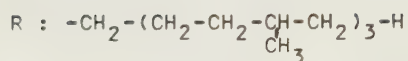


6-Chromanol

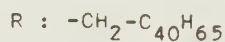


Tocophérols

Tocotriénols



Plastochromanol-8



NOMENCLATURE DES COMPOSES TOCOPHEROLIQUES NATURELS

Substituants du noyau	Tocophérols Chaîne I	Tocotriénols - Ancienne Chaîne II nomenclature
5-7-8 triméthyl	α tocophérol	α tocotriénol ou β_1 tocophérol
5-8 diméthyl	β tocophérol	β tocotriénol ou ϵ tocophérol
7-8 diméthyl	γ tocophérol	γ tocotriénol ou η tocophérol
8 monométhyl	δ tocophérol	δ tocotriénol

Il a été signalé un β_2 tocophérol qui correspondrait au 5-7 diméthylitol

linoléate de méthyle oxydé mis en présence de γ -tocophérol donne naissance à ce dérivé dans de fortes proportions. Il serait donc un intermédiaire entre le tocophérol et sa quinone. MAC HALE et GREEN (186) isolent de l'huile de coton un dimère du γ -tocophérol, DRAPER et al. (187) trouvent de petites quantités d'un trimère de l' α -tocophérol dans le foie du rat. SKINNER (188), pour expliquer la polymérisation des tocophérols, émet l'hypothèse de formation de trois types de radicaux libres : chromanoxyl (I), 5-benzylque (II) et isomère (III), (Figure 36).

Celle-ci se trouve en partie vérifiée par les résultats de LARS et al. (189) qui, à partir de l'huile de blé, isolent quatre dimères de tocophérol dont ils précisent la structure et le mécanisme de formation. L'un d'entre eux, dimère du γ -tocophérol (présent dans l'huile de coton) correspond au 5- γ -tocophéryloxy- γ -tocophérol et résulterait de la combinaison de (I) et (II). Ces auteurs ont en effet démontré (190) que le couplage oxydatif aurait lieu en position 5 lorsqu'il n'y a pas de substituant à cet endroit (ce qui est le cas pour le γ -tocophérol) et que si ladite position est substituée par un méthyle, il y a formation d'un couplage 5-benzylque (II) (Figure 37).

Bien que l'origine de ces polymères ne soit pas complètement élucidée, on admet généralement qu'ils peuvent apparaître comme artefacts du processus d'isolement, par oxydation à l'air et à la lumière (le γ -tocophérol se dimérise facilement, même conservé au froid) et que biologiquement il s'en formerait un peu. Malgré la deshydrogénation qui accompagne leur formation, ces oxypolymères conservent encore les propriétés réductrices de la fonction phénol.

3. Propriétés réductrices des tocophérols

Parmi les propriétés chimiques des tocophérols, l'oxydo-réduction joue un rôle de premier ordre. Selon les réactifs mis en présence, il existe plusieurs schémas réactionnels possibles à partir d'un tocophérol donné. En prenant le cas de l' α -tocophérol (191) (figure 38) :

- Les sels de fer (III) sont réduits en deux temps. Dans une première étape, il y a formation d'un époxyde métastable (192) qui, réversiblement en milieu réducteur (acide ascorbique) pourrait régénérer le tocophérol. Mais une telle structure évolue vers une forme paraquinonique stable (α -tocophérylquinone). Cette réaction est généralement utilisée dans les dosages colorimétriques. Après réduction des sels ferriques par les tocophérols, il suffit de faire agir un réactif spécifique du cation ferreux. La méthode d'EMMERIE-ENGEL (193), de toutes la plus utilisée, est basée sur la formation du complexe rose $\text{Fe (II)}-\alpha\alpha'$ -dipyridyle, dont on effectue le dosage par colorimétrie à 520 nm. HONNOLD et al. (194) ont automatisé la méthode et déterminent ainsi la teneur en tocophérol de l'huile de soja raffinée. Néanmoins, la réaction d'Emmerie-Engel présente certains inconvénients : spécificité médiocre, sensibilité assez basse, instabilité de la coloration avec le temps. En fait, le développement de la coloration est la résultante des cinétiques de deux réactions distinctes : réduction du Fe (III) par chaque tocophérol (les vitesses sont différentes selon le tocophérol), combinaison dans l'alcool du Fe (II) et du réactif. TSEN (195) compare divers réactifs et préconise une amélioration de la méthode en remplaçant l' $\alpha\alpha'$ -dipyridyle par la bathophénanthroline et en complexant l'excès de chlorure ferrique par l'acide phosphorique. Cette modification présente plusieurs avantages :

1) La limite de détection se trouve reculée puisque le E_{λ}^1 du complexe passe de 407 à 1050.

2) Les vitesses globales des réactions deviennent identiques pour les 4 tocophérols. Ceci pourrait s'expliquer en admettant que la stabilité du complexe avec la bathophénanthroline est telle que tout le Fe(II) est capté dès sa formation et que les composés intermédiaires (de type époxyde- Fe (II)) se transforment rapidement et également en quinones.

3) L'addition d'acide phosphorique évite les erreurs qu'entraînent des réductions photochimiques ultérieures.

Cette colorimétrie est adoptée par SCHMIDT (196) pour déterminer la teneur en tocophérol d'huiles d'arachide et de soja.

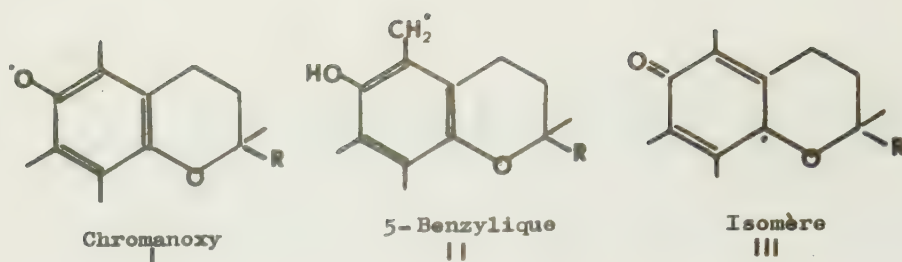


figure 36

Radicaux libres
formés à partir
de l' α -tocophérol

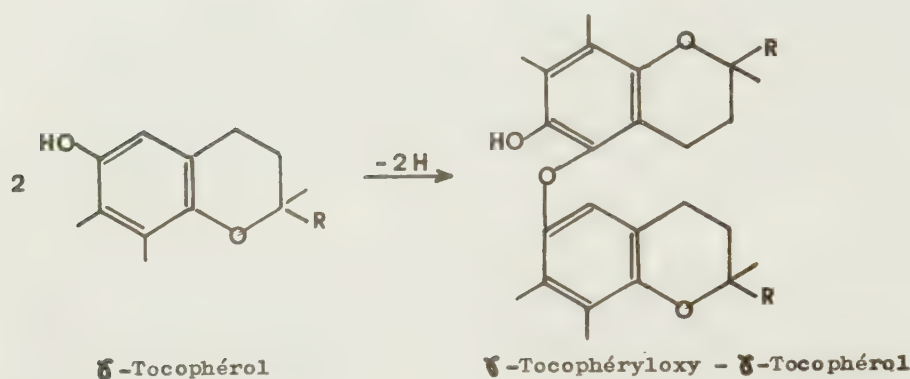


figure 37

Dimérisation du
 γ -tocophérol

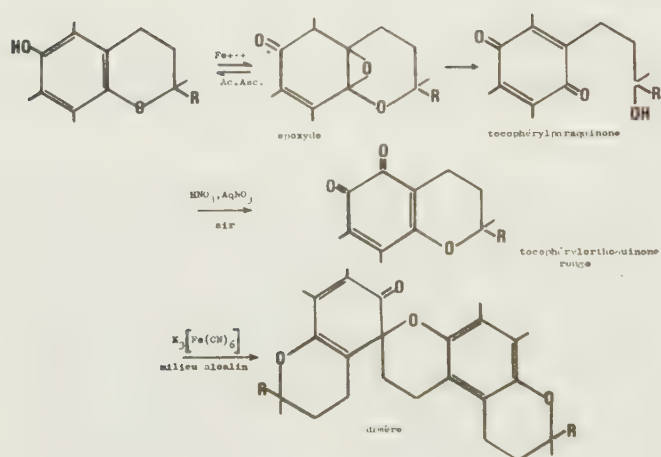
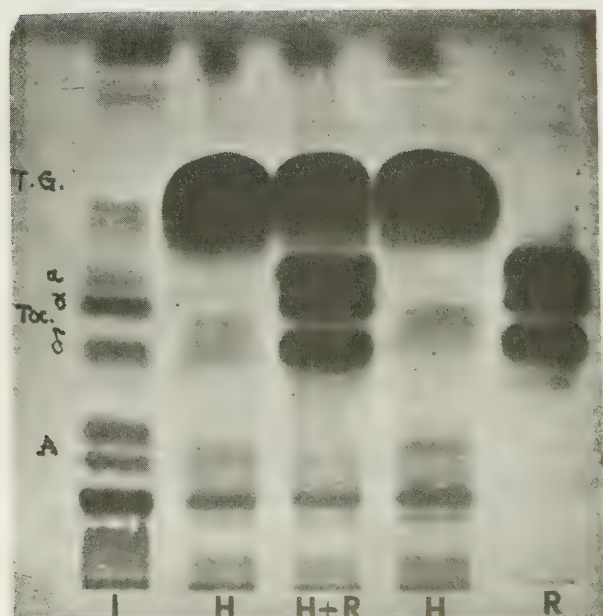


figure 38

Schéma d'oxydation
de l' α -tocophérol



Séparation d'un mélange
d'huile de soja
et de ses tocophérols

Dépôts - H : huile de soja
I : Insaponifiable
de soja
R : référence
(α , γ , δ tocophérols)

Constituants - T.G. : triglycérides
Toc : tocophérols
A : alcools ali-
phatiques et
terpéniques

Conditions - Gel de silice
G 0,5 mm
Eluant : éther de pétrole-éther
éthylrique (70:30)

Figure 39

- L'acide nitrique, les sels d'argent, l'air, agissent différemment et transforment les tocophérols α et γ en orthoquinones rouges. Les possibilités d'applications analytiques de la réaction avec l'acide nitrique ont été décrites par FURTER et MEYER (197). HARADA et al. (198) ont démontré que cette évolution des tocophérols de soja était responsable de la réversion de couleur de l'huile.

- Les ferricyanures alcalins oxydent les tocophérols et favorisent la formation de dimères que CSALLANY et DRAPER en 1963 (199) dénomment di- α -tocophérone, alors que NELAN et ROBESON (200) considèrent qu'une structure céto-éther est plus vraisemblable. Cette opinion a été confirmée et développée en 1969 par LARS et al. (201). Ces chercheurs ont démontré que l'on obtient deux types de produit : si le 6-chromanol a une position 5 non substituée, la réaction conduit à un trimère alors que, en cas de substitution du carbone 5 (α et β tocophérol), il y a formation d'un dimère avec liaison carbone, oxygène et couplage benzylique.

- Les sels de cérium (IV). L'oxydation des tocophérols par le nitrate ou le sulfate cerique est quantitative et cette réaction a été utilisée pour la détermination polarographique des tocophérols. En travaillant sur l'insaponifiable, KOLTUNOVA (202), puis NIEDERSTEBRUCK et al. (203) déterminent ainsi la teneur en divers tocophérols de plusieurs huiles. Cette méthode a l'avantage de rendre compte aussi des formes déjà oxydées (tocophérylquinones).

4. Réactions colorées des tocophérols

Les propriétés réductrices des tocophérols peuvent favoriser la formation de complexes colorés facilitant l'identification ou le dosage. Certains réactifs ont sur tous les tocophérols une action caractéristique (réduction de l'acide phosphomolybdique à froid), alors que d'autres développent une coloration propre à chacun des tocophérols. Il est donc possible de confirmer une indication générale par une série de tests et nous résumons les principaux dans le Tableau XXV.

TABEAU XXV

Principales réactions colorées des tocophérols

Réactif	Coloration	Spécificité
Fe(III)- $\alpha\alpha'$ dipyridyle	rose	tous les tocophérols et substances réductrices apparentées
dichlorofluoresceïne	rose en lumière naturelle	"
acide phosphomolybdique	bleue à froid rouge brun à froid	α, γ, δ β
acide nitrique	rouge	α et γ
acide nitreux	jaune	β, γ, δ
pentachlorure d'antimoine	brunâtre bleu-verte	β γ
O,dianisidine diazotée	bleu-verte brun-rouge	γ δ

5. Dosage des tocophérols totaux

La plupart des publications de ces dix dernières années concernant le sujet font mention de la méthode proposée en 1959 par le Jury "Vitamine E"

de l'Analytical Method Committee (de l'AOCs) (204) qui, en dépit d'une exécution laborieuse, est largement utilisée pour l'exactitude de ses résultats. Elle a l'avantage de faire la synthèse de tous les travaux antérieurs à cette date et sert à la fois de référence et de point de départ pour l'analyse détaillée. Elle comporte :

- Une saponification rapide (3 minutes) en présence de pyrogallol. TAUFEL et al. (205) le remplace par l'acide ascorbique.

- L'extraction de l'insaponifiable par l'éther éthylique, opération présentant quelques difficultés par suite de la transformation du pyrogallate alcalin en dérivés oxygénés lourds gênant le partage des deux phases.

- Le passage de l'insaponifiable en solution benzénique sur colonne de floridine traitée, dont la préparation et la percolation demandent environ 3 heures.

- La colorimétrie est réalisée selon EMMERIE-ENGEL sur une fraction de l'éluat. Ce dernier peut être concentré lorsque le corps gras renferme peu de tocophérols.

Une intéressante modification a été apportée par FLANZY et DUBOIS (206) qui travaillent directement sur l'huile, évitant ainsi la saponification et l'extraction de l'insaponifiable. Le passage sur colonne et la colorimétrie restent identiques, seules les quantités de réactif sont modifiées.

6. Fractionnement des mélanges de tocophérols

Ce sont surtout les techniques chromatographiques qui permettent de fractionner les concentrats tocophéroliques en leurs constituants. Il est indispensable de choisir convenablement les adsorbants, une trop forte activité favorisant les adsorptions irréversibles, une trop grande dispersion du produit sur support poreux pouvant faciliter son oxydation ; enfin, certaines propriétés de surface catalysent l'isomérisation.

a) Chromatographie sur couche mince

SEHER (207) sépare sur plaque d'alumine et de silice avec du chloroforme trois des quatre principaux tocophérols (α , $\beta+\gamma$, δ), alors que STOVE (208) obtient la séparation complète des quatre formes sur plaque de silice en développant à l'aide d'un mélange complexe (éther de pétrole-éther isopropylique-éther éthylique-acétone-acide acétique (85:12:4:1:1). GOVIND RAO et al. (209), à l'aide d'un tel système, précisent la nature et les teneurs relatives des tocophérols contenus dans plusieurs huiles. WHITTLE et PENNOCK (210), par chromatographie en deux dimensions de l'insaponifiable sur silice G, mettent en évidence les divers tocophérols et tocotriénols de quelques corps gras et en mesurent les quantités respectives par colorimétrie. La première migration à l'aide de chloroforme sépare mono, di et triméthylchromanols, alors que la deuxième, perpendiculaire avec comme éluant un mélange éther de pétrole-éther isopropylique (80:20), différencie les composés selon l'isomérisation et la saturation ou la non saturation de leur chaîne latérale.

JACKY (211), en déposant directement des huiles de soja et tournesol, prouve que naturellement les tocophérols n'existent pas sous forme d'esters, résultat que nous confirmons différemment et qui est valable aussi pour l'huile de colza.

b) Chromatographie en phase gazeuse

Les premiers travaux sont ceux de WILSON et al. (212) en 1962, qui chromatographient plusieurs tocophérols libres et estérifiés sur colonne de SE 30, QF 1, polyesters, peu imprégnés (4 à 5 %). Ils constatent que le silicone SE 30 donne les meilleures séparations et que les formes esters (acétates) sont préférables étant donné la reproductibilité des résultats qu'elles procurent. Les to-

cophérols α , γ , δ et leurs triméthylsilyléthers (TMS) sont chromatographiés sur SE 52 par NAIR et TURNER (213), mais les formes β et γ ne sont pas séparées. LIBBY et SHEPPARD (214) développent l'aspect quantitatif de l'analyse en comparant les réponses des tocophérols et de leurs formes acétates et en étudiant l'influence de la quantité injectée, de la saponification, du taux de phase stationnaire. Les dérivés donneraient les meilleures réponses. Le problème de l'interférence des deux diméthyltolcols (β et γ) est en partie résolu par SLOVER et al. (215) qui chromatographient les TMS sur colonne de verre de 5 mètres imprégnée à 2 % de SE 30. NELSON et al. (216) analysent par le même chromatogramme les stérols et tocophérols de soja provenant de condensat de désodorisation et séparent convenablement les divers composés de ce mélange sur colonne de 2 mètres de Gas Chrom Q imprégné à 4 % de SE 30. SLOVER et al. (217) décrivent une méthode de détermination des tocophérols et tocotriénols dans les aliments, prenant pour point de départ l'insaponifiable de l'extrait lipidique et combinant chromatographie sur couche mince et en phase gazeuse. Cette façon de procéder, malgré la succession d'opérations qu'elle impose, nous paraît être la plus satisfaisante pour l'étude détaillée d'un mélange de tocophérols.

7. Tocophérols dans les huiles de colza, soja et tournesol

a) Teneur

Les valeurs parfois divergentes rencontrées dans la littérature (Tableau XXVI) peuvent s'expliquer car la teneur en tocophérols totaux d'un corps gras donné varie dans d'assez grandes proportions, selon son origine, son état d'altération, les opérations technologiques qu'il a pu subir. La méthode de détermination elle-même n'est pas sans influence sur le résultat (218).

TABLEAU XXVI

Tocophérols des huiles de colza, soja et tournesol

Huile	Etat	Tocophérols totaux en $\mu\text{g/g}$	Tocophérols individuels %				Auteurs
			α	β	γ	δ	
Colza	brute	673	35,3	-	63,1	1,6	WHITTLE (210)
Soja	brute	1721	11,2	-	55,9	28,1	TAUFEL (205)
	brute	1140	7	-	58	35	SCHMIDT (219)
	raffinée	870	11,5	-	63	63	"
Tournesol	brute	730	85,5	-	14,5		JACKY (220)
	raffinée	515	93	-	7		
	* ?		90-95	-	10-5	1	NIEDERSTEBRUCK (203)

* résultats d'analyse par polarographie

b) Composition

Dans les trois huiles étudiées, il faut remarquer que l' α -tocophérol est toujours présent. Il en est de même du γ -tocophérol qui, de plus, est souvent majoritaire dans la composition centésimale. Le δ -tocophérol se rencontre surtout dans l'huile de soja et en très faible proportion dans les huiles de colza et de tournesol.

ETUDE DU DOSAGE DES TOCOPHEROLS TOTAUX

1. Comparaison de deux méthodes de dosage

Sur huiles brutes, nous avons déterminé la teneur en tocophérols totaux par la méthode de l'AACS (204) et par la méthode de FLANZY et DUBOIS (205). Dans le premier cas, la saponification pourrait entraîner une altération des tocophérols et donc une perte pour le dosage. Pratiquement, on opère avec précautions (milieu réducteur) et les taux de récupération de quantités connues d' α -tocophérol (incorporées à une huile n'en contenant pratiquement pas) sont supérieurs à 95 %. Cette opération, en outre, a l'avantage de libérer les tocophérols engagés dans des combinaisons du type ester qui, autrement, échapperaient à la mesure.

Les résultats de cette comparaison figurent dans le Tableau XXVII.

TABLEAU XXVII
Comparaison de différentes méthodes d'extraction
des tocophérols
(teneurs exprimées en $\mu\text{g/g}$ d' α -tocophérol)

Huiles	Dosage sur huile purifiée (205)	Dosage sur insaponifiable purifié (204)	Dosage après fractionnement de l'huile sur couche demi-épaisse		
			Monomères	Polymères	Total
Colza	850	800	685	140	825
Soja	1280	1300	905	345	1250
Tournesol	900	940	710	180	890

Pour une même huile, nous constatons que les deux chiffres sont très voisins, l'écart le plus important concerne le colza pour lequel on note une différence par défaut de 6 % à la saponification. Pour les huiles de soja et tournesol, c'est l'inverse, ce qui indiquerait qu'une faible fraction des tocophérols (respectivement 1,5 et 4,5 %) existe naturellement sous forme estérifiée. Nous confirmons donc d'une manière différente des conclusions antérieures (220). La valeur élevée de la teneur en tocophérols totaux de l'huile de tournesol s'explique en précisant sa qualité : elle est pressée à froid et destinée à des usages diététiques.

Pour un corps gras contenant très peu ou pas de tocophérols liés, la méthode directe donne des indications satisfaisantes mais, bien qu'évitant l'étape de la saponification, son exécution comporte toujours le passage de l'échantillon sur colonne de Floridine. La préparation de cette colonne, puis sa percolation, demandent environ 3 heures. Nous nous sommes efforcé de réduire la durée de cette purification en la remplaçant par une chromatographie préparative sur couche de silice G pour laquelle dépôt, migration et récupération sont réalisables en une heure.

2. Mise au point d'un dosage direct des tocophérols libres

Par le gain de temps qui la caractérise par rapport aux méthodes sur colonne, la chromatographie sur couche demi-épaisse nous a paru être une solution avantageuse pour isoler les tocophérols libres d'une huile avant de les soumettre au dosage par colorimétrie.

Définition des conditions opératoires

Préparation de l'échantillon

Elle est identique à celle de la méthode de FLANZY, l'huile est mise en solution benzénique à 20 %, seules les quantités sont réduites (dépôt de 0 à 100 mg, soit 100 à 500 μ g de solution).

Nature de l'adsorbant

Nous avons adopté le gel de silice G en couche de 0,5 mm. Les plaques sont séchées à l'air 3 heures, puis activées 1 heure à l'étuve à 105°. L'alumine est à éviter par suite des isomérisations qu'elle peut entraîner.

Technique de développement

Les tocophérols étant photosensibles, la cuve de développement est placée en demi-obscurité. Des essais de développement en atmosphère d'azote n'ont pas modifié quantitativement nos résultats ; par contre, il semble important d'opérer en cuve saturée. L'éluant devait répondre à la double condition : séparer d'une part l' α -tocophérol des triglycérides qui sont en excès ; d'autre part, le δ -tocophérol des alcools aliphatiques et terpéniques. Nous avons essayé le chloroforme (207), les mélanges éther de pétrole-éther éthylique-acide acétique (220) et plusieurs compositions du système éther de pétrole-éther éthylique. Le rapport 70:30 a été retenu car il donne par développement simple un résultat satisfaisant (figure 39), p. 78

Délimitation des zones à récupérer

Etant donné la faible teneur du produit, réparti sur une large bande, les indicateurs fluorescents (dichlorofluoresceine) sont peu sensibles et il est préférable de faire migrer parallèlement un étalon, qui sera un mélange des tocophérols α et δ , un concentrat commercial (type Tocomix), un insaponifiable de soja. Au sortir de la cuve, on doit prendre soin d'exposer la plaque le moins longtemps possible à l'action de l'air, les tocophérols se trouvant alors dans des conditions propices à leur oxydation. SCHMIDT (219) conseille d'imprégner les bandes concernées de méthanol à 85 %. Nous-mêmes, couvrons immédiatement la surface de l'adsorbant par deux contre-plaques (fermement appliquées grâce à des pinces métalliques) qui se situent de part et d'autre de l'aire de migration de l'étalon, laissée à découvert. La pulvérisation d'un réactif approprié (acide phosphomolybdique à 20 % dans l'éthanol, réactif d'Emmerle-Engel) permet de localiser les zones à récupérer.

Récupération des tocophérols

On découvre les contre-plaques et l'on délimite rapidement les bandes. Le grattage de l'adsorbant est réalisé à l'aide d'une lamelle de téflon (éviter les spatules métalliques ou les systèmes d'aspiration) et la poudre est immédiatement placée dans une petite colonne de verre. Les tocophérols sont désorbés par l'éther éthylique.

Colorimétrie

L'amélioration de sensibilité que procure l'utilisation de la batho-phénanthroline permet de diminuer les quantités d'huile déposées. Pour tenir compte d'une éventuelle action du support, une partie de celui-ci sera extraite et servira de solution de référence. Les lectures sont faites sur courbe d'étalonnage (figure 40)

Résultats et discussion

Les chiffres trouvés (figurant dans le Tableau XXVII, p. 82) pour les trois huiles sont inférieurs à ceux obtenus avec les deux méthodes précédemment expérimentées. Les différences (de 20 % ou plus) ne peuvent pas s'expliquer par

des pertes inhérentes à la technique décrite, des essais avec différentes quantités d' α -tocophérol (de 10 à 50 μ g) ayant toujours donné des taux de récupération d'au moins 93 %. Il faut donc supposer que les tocophérols libres ne sont pas seuls à intervenir dans la colorimétrie après purification sur colonne de Floridine. Nous avons montré que la forme ester était mineure ou même absente et, de plus, elle n'est pas susceptible de s'engager dans la réaction aboutissant à la formation du complexe coloré. D'autre part, au cours de notre étude bibliographique, nous avons noté que des déterminations de tocophérols totaux réalisées à partir de l'insaponifiable fractionné sur couche mince conduisent à des résultats anormalement bas. Ainsi, WHITTLE et al. (222) sur huiles brutes de maïs et de soja donnent respectivement 535 et 564 μ g/g !

3. Mise en évidence de formes polymères

Pour tenter d'expliquer cette anomalie, les insaponifiables des trois huiles ont été chromatographiés par C.C.M. La révélation est faite, d'une part à l'aide du réactif d'Emmerie-Engel (mélange à volume égal des solutions éthanoliques à 0,5 % de FeCl_3 , 6 H_2O et $\alpha\alpha'$ -dipyridyle) et, d'autre part avec la solution d'acide phosphomolybdique (figure 41). Pour chaque insaponifiable déposé, il apparaît une série de taches qui, selon leur localisation, peuvent être classées en deux groupes : dans la moitié inférieure de la plaque, on retrouve les deux ou trois tocophérols libres (α , γ , δ), alors que la partie supérieure présente une tache et, dans le cas du soja, deux, qui correspondraient à des constituants moins polaires que les tocophérols mais doués comme eux de propriétés réductrices. La migration de γ -tocophérol pur conservé sans précaution permet de détecter deux composés : le tocophérol lui-même et un dérivé moins polaire, réducteur, de R_f identique à celui du constituant P_1 trouvé dans les insaponifiables des trois huiles. Ces constituants moins polaires dérivant des tocophérols et en conservant les propriétés réductrices correspondent aux formes dimères signalées précédemment. Selon toute vraisemblance, P_1 serait un dimère du γ -tocophérol, alors que P_2 serait un dimère du δ -tocophérol ou un dimère mixte $\gamma\delta$. KOMODA et HAPADA (221)² ont identifié et dosé le 5- γ -tocophéroxyl- γ -tocophérol dans l'huile de soja et montré que sa teneur dans l'huile était en relation avec le degré d'humidité de la graine.

La bande correspondant aux formes polymères doit être récupérée. Il est ainsi possible d'apprécier les quantités de polymères contenus dans l'échantillon et les résultats ajoutés aux précédents donnent des valeurs comparables à celles obtenues à l'aide des techniques sur colonne. Ces formes étant toujours présentes dans les concentrats, il n'y a pas de difficultés pour les récupérer ; elles réagissent seulement moins vite pour donner des dérivés colorés.

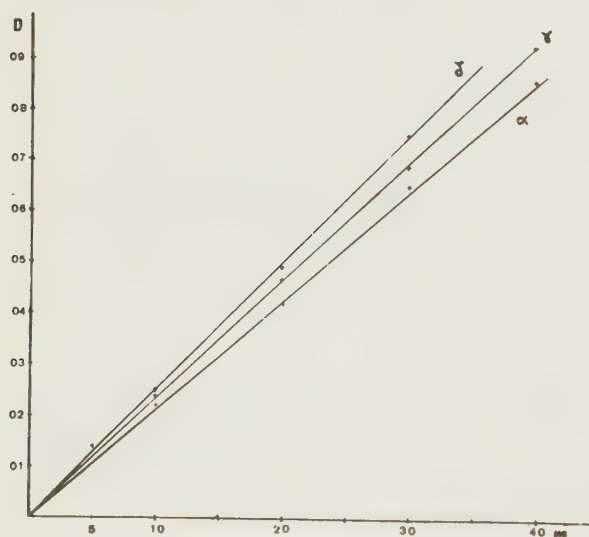


Figure 40

Courbe d'étalonnage pour le dosage colorimétrique des tocophérols utilisant le complexe Fett-Bathophénanthroline

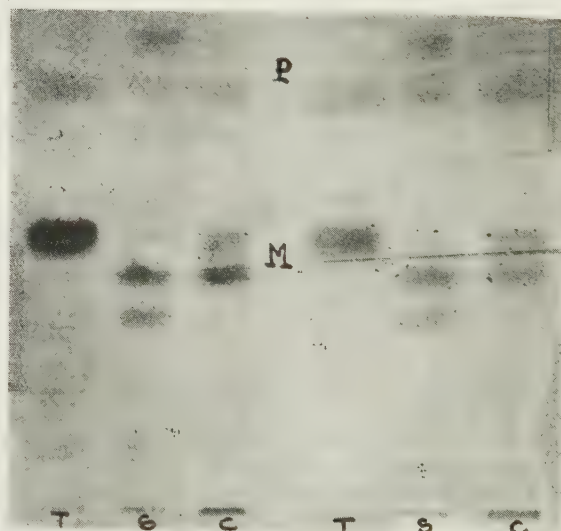


Figure 41

Mise en évidence des polymères de tocophérols

Dépôts d'insaponifiables
C : colza T : tournesol
S : soja M : monomères
P : polymères

Révélation : E Engel -
Réactif d'Emmerie-Engel
Ph. Molyd : acide
phosphomolybdique

1. Chromatographie sur couche mince

Nous avons réalisé plusieurs séries d'essais sur plaque avec des couches de silice G de 0,5 mm, puis 0,25 mm d'épaisseur, contenant l'indicateur. Seules, les conditions d'activation et de développement varient.

Obtention des tocophérols purs

Ne disposant que d'un échantillon d' α -tocophérol pur, nous avons isolé les tocophérols γ et δ à partir d'un concentrat commercial. La chromatographie sur couche mince du produit montre qu'il contient, outre les tocophérols, d'autres constituants de l'insaponifiable (stéroïdes, alcools, hydrocarbures). Le fractionnement du mélange sur couches de 0,5 mm, puis de 0,25 mm, nous a permis de récupérer des produits dont la pureté a été contrôlée et qui nous servirent de référence pour la construction des droites d'étalonnage en colorimétrie (figure 40).

Détermination des tocophérols individuels à partir des insaponifiables

Les insaponifiables des trois huiles, préparés comme il a été indiqué, ont été déposés sur plaques puis développés en une dimension. Des spots de référence (α , γ , δ tocophérols) permirent l'identification. Les R_f relatifs par rapport à l' α -tocophérol (R_{α} T) correspondant à chaque tache sont reportés dans le Tableau XXVIII.

Le développement à deux dimensions nous a permis de vérifier l'absence de tocophérols dans les trois huiles étudiées car nous n'avons pas constaté de dédoublement des taches comme c'est le cas pour l'huile de palme (figure 42).

Des séparations différentes sont observées en augmentant l'activité de l'adsorbant (183). Il apparaît une tache supplémentaire T localisée entre l' α et le γ -tocophérol. Pour l'huile de lin, le composé qui en est responsable a été identifié comme étant un plastochromanol-8 (184) et on note aussi cette tache avec les insaponifiables des huiles de colza et soja.

La chromatographie préparative des tocophérols individuels est réalisée en déposant sur plaque la solution benzénique d'insaponifiable. Après extraction de chaque bande, on effectue le dosage colorimétrique et les densités optiques lues sont reportées sur les droites d'étalonnage précédemment construites.

Les résultats de ces mesures sont rassemblés dans le Tableau XXIX (1ère partie) et confirment que seules les huiles linoléiques contiennent des plastochromanols. D'autre part, la comparaison avec le Tableau XXVI, p. 81 montre que dans les conditions normales de chromatographie sur couche mince la bande représentative de ces constituants est comptée avec celle du γ -tocophérol.

2. Chromatographie en phase gazeuse

Les tocophérols et produits apparentés peuvent être étudiés par chromatographie en phase gazeuse à condition de prendre quelques précautions par suite de la grande réactivité du groupement hydroxyle en 6 (polarité propre, oxydo-réduction). A l'état libre, et étant donné les quantités injectées (5 à 10 μ g environ), il n'a pas été possible d'obtenir de résultat satisfaisant en utilisant un tube d'acier inoxydable ; du reste, la plupart des travaux à ce sujet recommandent un tube de verre. Les dérivés du type ester ou éther ont le double avantage de diminuer la polarité de la molécule et d'en augmenter la stabilité, ils permettent d'utiliser les deux types de tube et, pour notre part, nous avons choisi

TABLEAU XXVIII

Analyse qualitative des tocophérols par chromatographie

Conditions opératoires	R _T des tocophérols			P ₁ Poly	P ₂ Poly	Plastochromanol
	α	γ	δ			
<u>Couche mince</u> silice G 1 h - 110°C EP-EE (70:30)	1	0,86	0,72	1,53	1,72	
<u>Phase gazeuse</u> squalane = 1						
	Temps de rétention par rapport au squalane					
tocophérols	3,33	2,38	1,85	-	-	3,80
tocotriénols	4,35	3,05	2,36			

TABLEAU XXIX

Analyse quantitative des tocophérols

		Tocophérols %			Plastochromanol
		α	γ	δ	
<u>Colorimétrie</u>	(colza)	32,5	52,5	-	15
	(soja)	10,8	50,6	20,1	9,2
	(tournesol ...)	80,6	10,4	-	-
<u>Phase gazeuse</u>	(colza)	32	60		8
	(soja)	7,6	62,4	30	-
	(tournesol ...)	91	9		
	(arachide)				
	(raffinée)	30	61		
	(arachide				
	(+ 10 %)				
	(soja (huiles raffinées) ...)	38,3	55,3	6,4	

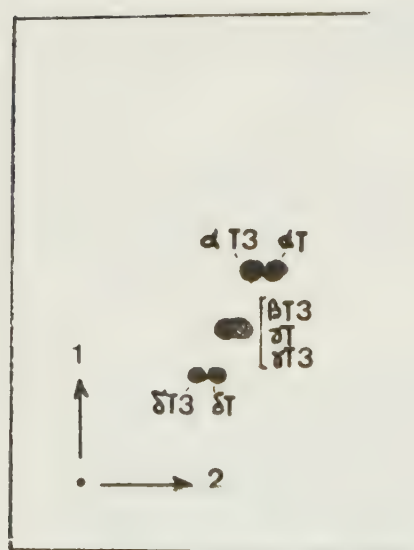


Figure 42

Chromatographie sur couche mince des tocophérols de l'huile de palme
(Développement à deux dimensions)

1. Chloroforme
2. Ether de pétrole-éther isopropylique (80:20)

si l'acier inoxydable. Les réponses des acétates et silyléthers sont comparables, mais la préparation de ces derniers est beaucoup plus rapide malgré des inconvénients d'utilisation que nous avons tenté de réduire. Nous avons d'abord adopté la méthode générale de silylation décrite par PREVOT et BARBATI (147), en l'adaptant aux quantités que nous traitions (500 μ g). Il nous a paru plus avantageux d'utiliser une microméthode (217) dont le réactif une fois préparé peut servir pour plusieurs essais.

Analyses qualitative et quantitative

Les différents pics des chromatogrammes ont été identifiés par leurs distances de rétention rapportées au squalane, cette substance ayant servi de référence dans des mélanges connus (α , γ , δ , huile de palme). Nous donnons les temps de rétention relatifs dans le Tableau XXVIII pour trois tocophérols, trois tocotriénols et un plastochromanol.

Il a été démontré que les coefficients de réponse des divers tocophérols sous forme de silyléthers sont très semblables (217) ; il est donc possible d'évaluer facilement les pourcentages des différents constituants du mélange. Pour les huiles analysées par ce procédé, les résultats figurent dans le Tableau XXIX (2ème partie).

Résultats et discussion

- Du point de vue qualitatif, la chromatographie en phase gazeuse nous permet de mettre en évidence, pour la fraction tocophérolique de l'huile de colza, un pic de temps de rétention 3,80 non représentatif d'un tocophérol ou d'un tocotriénol. Nous avons constaté que l'huile de lin contenait ce constituant dans la proportion de 20 % des tocophérols totaux. Etant donné nos conditions opératoires et la taille de la molécule du plastochromanol-8 signalé dans cette huile, il est peu vraisemblable que ce composé puisse être élué. Ceci signifierait que la tache T observée sur couche mince correspond principalement à un plastochromanol de poids moléculaire inférieur à celui du plastochromanol 8.

- Les résultats quantitatifs obtenus par colorimétrie et chromatographie en phase gazeuse montrent une grande similitude dans le cas de l'huile de tournesol. Pour le colza et le soja, la comparaison est plus difficile à établir étant donné que les plastochromanolis peuvent en partie échapper à la détermination par voie gazeuse. Il apparaît aussi que la tache T contient un constituant se comportant comme le γ -tocophérol dans nos conditions de chromatographie en phase gazeuse, qui peut être le β -tocophérol ou le troisième isomère le 5-7 diméthyltolcol ou β -tocophérol.

Application : détection de l'huile de soja dans l'huile d'arachide

L'addition d'huile de soja à l'huile d'arachide est difficile à prouver car l'acide linoléique est souvent confondu avec l'acide arachidique et, pour de faibles teneurs, les stérols sont qualitativement semblables. En ce qui concerne les tocophérols, la teneur de l'huile d'arachide est en moyenne de 250 μ g/g et les constituants sont l' α -tocophérol (33 %) et le γ -tocophérol (67 %) (1). Si l'on établit une comparaison avec le contenu tocophérolique de l'huile de soja, d'une part le rapport des teneurs en tocophérols totaux, d'autre part la présence de δ -tocophérol (30-35 %), sont très favorables à la détection de petites quantités de soja dans l'arachide. Nous avons réalisé un mélange d'huiles raffinées 10 % soja - 90 % arachide (en poids). Un gramme de ce mélange est saponifié selon la méthode de l'AACS, l'insaponifiable est fractionné sur plaque et les tocophérols totaux après récupération sont transformés en dérivés silylés. Le chromatogramme (figure 43) montre que l'on pourrait détecter sans difficultés 2 % de soja (ce qui correspondrait alors dans les mélanges à $\approx$ 1 % de δ -tocophérol).

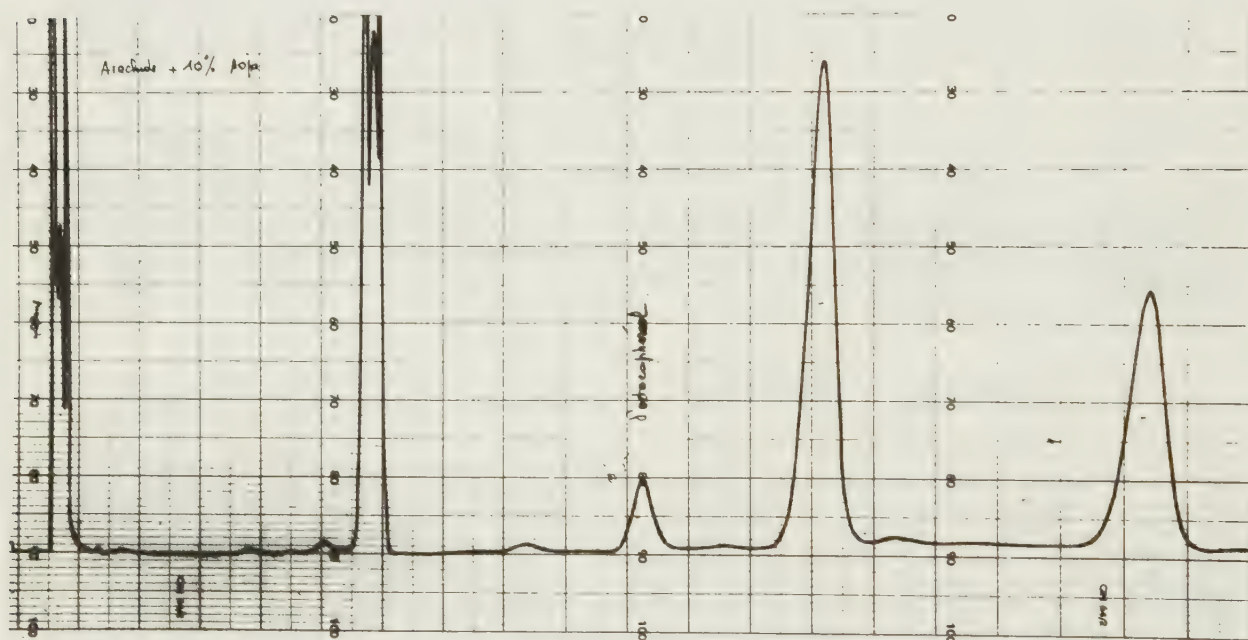
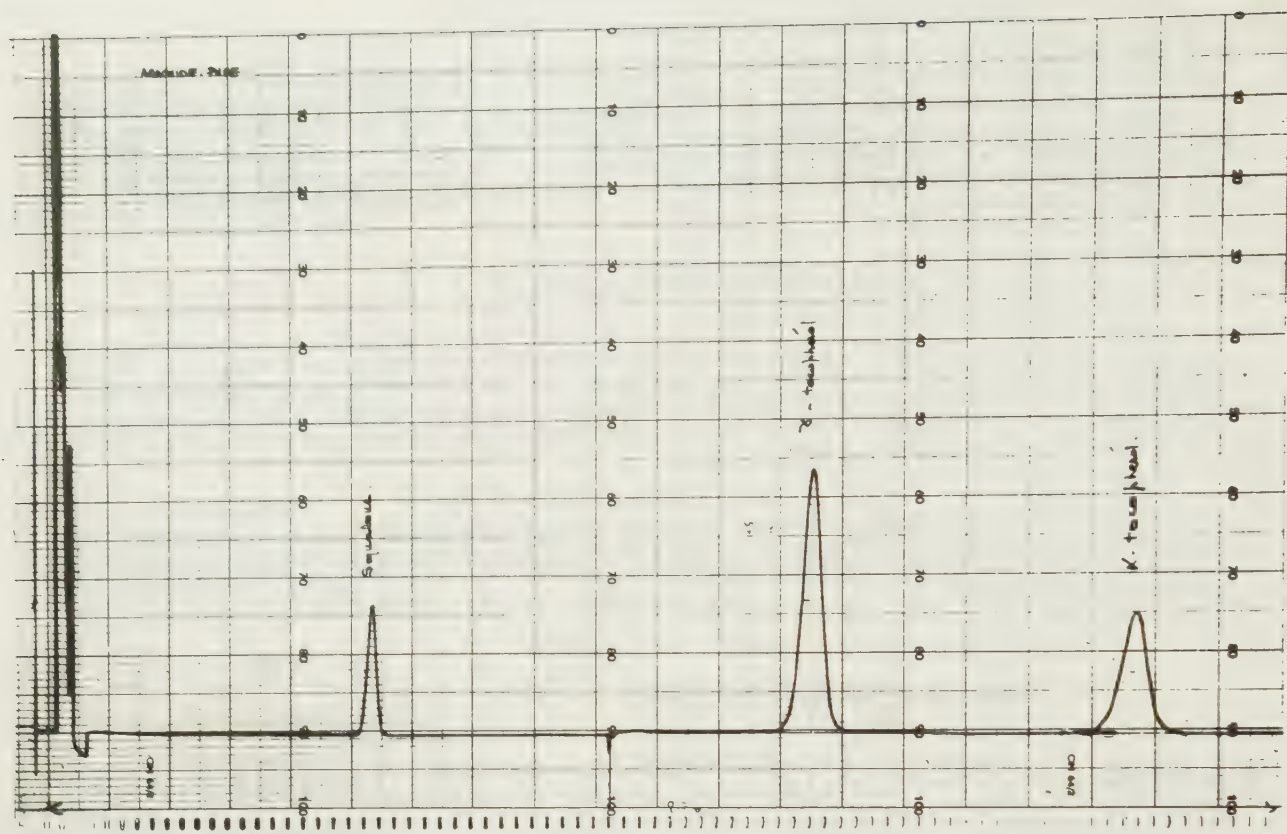


Figure 43

Chromatographie en phase gazeuse des tocophérols de l'huile d'arachide pure, puis d'un mélange des huiles d'arachide et de soja

CONCLUSION

La première partie de notre travail avait pour objet d'établir des comparaisons qualitatives et quantitatives entre différentes méthodes d'obtention de l'insaponifiable. Prenant comme matière d'oeuvre l'huile de colza et pour référence les deux méthodes de la Norme Française, nous avons examiné les possibilités de modifications opératoires proposées au niveau de la saponification, de l'extraction et du lavage. Par exemple, la saponification de courte durée précédant l'analyse des tocophérols sera retenue dans la recherche d'une méthode rapide de dosage. L'extraction liquide-liquide, quelle que soit la technique adoptée (ampoules, extracteurs), conduit sensiblement aux mêmes chiffres, bien que nous ayons tenté d'améliorer le taux d'extraction par la modification d'appareils existants et en mettant au point un modèle semi-continu. Au cours du lavage, la présence dans les extraits de faibles quantités d'acides gras est générale et ceux-ci ne sont totalement éliminés que par l'eau-alcool à 50 %. Ces impuretés gênantes pour un fractionnement ultérieur en C.C.M. devront être fixées soit par l'alumine, soit par des couches de silice alcaline, comme nous l'avons recommandé. L'enrichissement préalable de l'huile en non glycérides par cristallisation fractionnée est particulièrement indiqué pour la préparation de quantités importantes d'insaponifiable.

Dans la deuxième partie de notre étude, les insaponifiables des huiles de colza, soja et tournesol, ont été fractionnés à l'aide des techniques chromatographiques. Les méthodes sur colonne, par les fortes capacités de charge les caractérisant, présentent surtout un intérêt préparatif. Sur alumine, à l'aide d'un insaponifiable synthétique, nous avons défini un schéma d'élution scindant le mélange en quatre fractions principales : hydrocarbures, tocophérols, alcools, stérols. Sur silice, un même éluant est utilisé tout au long de la chromatographie et, de cette façon, nous avons pu isoler facilement des familles de constituants d'une grande pureté (alcools triterpéniques).

La chromatographie sur couche mince, avec un adsorbant standard comme le gel de silice G, est une méthode de choix pour l'étude analytique de l'insaponifiable. L'influence du mode de développement sur le résultat des séparations a été spécialement étudiée. Alors qu'une réduction du volume des chambres permet de séparer convenablement alcools aliphatiques et terpéniques, par migrations multiples nous avons différencié, d'une part alcools totaux, et d'autre part, méthylstérols.

La chromatographie préparative sur couche demi-épaisse suivie d'une gravimétrie nous a permis de faire une estimation semi-quantitative des principaux

constituants : hydrocarbures, alcools, stérols. Un dosage des stérols in situ par densitométrie a été expérimenté. Enfin, une application pratique de la chromatographie préparative sur couche demi-épaisse a été développée. A partir d'esters méthyliques d'une huile de soja, nous avons isolé les stérols totaux pour en faire ensuite l'analyse par chromatographie en phase gazeuse.

La troisième partie était consacrée à l'étude des constituants eux-mêmes. Ils sont, pour la plupart, de nature ou d'origine terpénique et seuls les hydrocarbures paraffiniques et alcools aliphatiques font exception à cette règle.

Les paraffines renferment trois séries d'homologues (alcanes, isoalcanes, antéisoalcanes) mais, dans une même série (alcanes), les termes impairs sont plus abondants que les homologues pairs avec prédominance de n-nonacosane (C_{29}) et de n-untriacontane (C_{31}).

Le squalène est un constituant important ; nous l'avons dosé, après récupération sur plaque, par chromatographie en phase gazeuse. Des familles mineures d'hydrocarbures ont été détectées mais non identifiées.

Les alcools aliphatiques analysés par chromatographie en phase gazeuse renferment principalement des termes pairs : docosanol, tétracosanol, hexacosanol. Leur composition s'apparente à celle des alcools de cire.

Les alcools triterpéniques forment un mélange complexe dont les composants (sous forme d'acétates époxydés) ont été séparés par C.C.M. et par chromatographie en phase gazeuse. A côté du cycloarténol et du 24-méthylène-cycloartanol toujours présents, chaque huile renferme quelques autres constituants non identifiés faute de substance de référence.

La chromatographie en phase gazeuse des stérols dans des conditions bien choisies nous a montré que les mélanges stéroliques naturels comportent plus de constituants que ceux habituellement considérés (isomères). Nous avons confirmé l'existence de Δ^7 -stigmasténol dans le tournesol que nous avons rencontré aussi dans le soja.

Dans les trois huiles, la présence logiquement prévisible de methylstérols a été démontrée. Par spectrométrie de masse, nous avons identifié le lophénol, le 24-méthylène lophénol et le citrostadiénol. L'identification et le dosage des pigments chlorophylliens et caroténoïdes ont été réalisés sur l'huile elle-même et sur insaponifiable à l'aide des techniques chromatographiques et spectrophotométriques.

En comparant les résultats du dosage des tocophérols totaux avant et après saponification, nous avons pu déduire que ceux-ci existaient surtout sous forme libre dans l'huile. La purification préalable de l'insaponifiable sur colonne de Floridine a été remplacée par une chromatographie préparative sur couche de silice suivie d'un dosage par colorimétrie avec la bathophénanthroline. Dans les trois exemples étudiés, la présence de polymères a été démontrée. Les différents tocophérols ont été identifiés puis évalués par colorimétrie et chromatographie en phase gazeuse. Une application à la détection des mélanges d'huile de soja dans l'arachide illustre les possibilités de cette dernière méthode.

o

o o

L'analyse de l'insaponifiable axée sur l'étude de la composition d'une fraction (stérols) est considérée maintenant comme une opération de contrôle. Par contre, l'examen un peu détaillé du mélange très complexe que représente cette matière devient rapidement un travail de recherche dont les limites seront fixées par la sensibilité des méthodes et de l'appareillage à notre disposition.

-:-:-:-:-:-:-

ANNEXE EXPÉRIMENTALE

1. METHODES NORMALISEES

Dosage de l'insaponifiable (Norme Française T 60-205)A. METHODE A L'HEXANE1. Réactifs

1. Hexane normal pur (*)
2. Acide chlorhydrique $d = 1,19$
3. Alcool éthylique à 50°
4. Solution de potasse caustique à 12 % environ dans l'alcool éthylique à 95 °

2. Appareillage

- Ballon 100 NF B 35-005, muni d'un réfrigérant
- Ballon 250 NF B 35-005
- Ampoules à décantation
- Etuve

3. Mode opératoire

Mettre la prise d'essai de 5 g (pesés au centigramme) dans le ballon muni du réfrigérant ascendant, y ajouter 50 ml de la solution alcoolique de potasse (4) et porter à légère ébullition. Il est recommandé d'ajouter un régulateur d'ébullition (pierre ponce, billes de verre, porcelaine, etc...). Maintenir l'ébullition pendant 1 heure et prolonger jusqu'à 2 heures pour les produits à haut point de fusion et spécialement les cires. Ajouter alors par le haut du réfrigérant 50 ml d'eau distillée. Agiter, laisser refroidir et transvaser le contenu du ballon dans une ampoule à décantation. Rincer le ballon, en opérant en plusieurs fois avec, au total 50 ml d'hexane (1), qui est ensuite transvasé dans l'ampoule à décantation. Agiter énergiquement pendant 1 minute pour assurer un contact intime entre l'hexane et la solution savonneuse. Abandonner au repos et, quand les deux phases sont complètement séparées, soutirer dans une deuxième ampoule à décantation la solution savonneuse qu'on épuise de nouveau, avec 50 ml d'hexane. Si, par exception, des émulsions se présentent, les détruire par l'addition de petites quantités d'alcool ou de lessive de potasse concentrée, ou éventuellement de chlorure de potassium en solution dans l'alcool.

Si on soupçonne la présence de savons métalliques (existence de cendres, d'après la Norme NF T 60-209), ajouter alors à la solution étherée 10 gouttes d'acide chlorhydrique (2) ; secouer vigoureusement (*) puis soutirer l'acide décanté. Reprendre alors la suite normale des opérations ci-dessous.

Les trois portions d'hexane sont alors réunies dans une même ampoule et lavées trois fois de suite avec, chaque fois, 50 ml d'alcool (3). S'il y a lieu, éliminer l'eau par addition de sulfate de sodium anhydre, puis filtrer. Transvaser la solution d'hexane dans le ballon. Chasser le solvant par distillation et porter, dans une étuve réglée à 100°-105°, le ballon maintenu en position horizontale. Après un quart d'heure minimum de séjour à l'étuve, laisser refroidir et peser. Faire des pesées jusqu'à ce que la perte de masse entre deux pesées consécutives soit inférieure à 2 mg.

Quand la teneur en insaponifiable est très faible, il est intéressant, pour éviter des erreurs de pesée, de transvaser la solution contenant l'insaponifiable dans une capsule anti-grimpante en verre mince, en prenant toutes les

(*) Dans le cas où il n'aura pas été possible de se procurer de l'hexane de pureté suffisante, le remplacer par de l'éther de pétrole distillé entre 40°C et 60°C, d'indice de brome inférieur à 1 et fraîchement redistillé.

(*) Environ vingt cinq fois

précautions d'usage.

En suivant rigoureusement le mode opératoire ci-dessus, l'insaponifiable est exempt de savon. Néanmoins, pour éviter des causes d'erreur, qui résulteraient d'un entraînement accidentel, incliner l'insaponifiable obtenu et, s'il laisse des cendres, en doser l'alcalinité en présence d'hélianthine avec une liqueur d'acide décinormale; un centimètre cube de cette liqueur représente 0,032 g de savon de potassium à déduire.

4. Expression des résultats

Soit M la masse en grammes de la prise d'essai
m la masse en grammes du résidu
Le pourcentage d'insaponifiable est égal à $\frac{m}{M} \times 100$

B. METHODE A L'OXYDE D'ETHYLE

1. Réactifs

1. Oxyde d'éthyle d = 0,714 (à 20 ° C) exempt de peroxyde
2. Acide chlorhydrique d = 1,10
3. Alcool éthylique 95 %
4. Acétone
5. Solution alcoolique de potasse concentration minimum de 3 % à 4 %
6. Solution aqueuse de potasse environ 3 %
7. Solution alcoolique de potasse N/10
8. Phénolphaléine en solution alcoolique à 1 %

2. Appareillage

- . Ballon de 250 ml et réfrigérant à reflux, de préférence assemblés par rodage
- . Bain-Marie
- . Deux ampoules à décantation de 500 ml
- . Ballon large 250 NF B 36-005, taré
- . Etuve réglée à 100°-105°C

3. Mode opératoire

Mettre la prise d'essai de 5 g (pesés au centigramme) dans le ballon de 250 ml (à 1 ml près) de solution alcoolique de potasse (5). Il est recommandé d'ajouter un régulateur d'ébullition (pierre ponce, billes de verre, porcelaine, etc...)

Adopter le ballon au réfrigérant à reflux et maintenir à douce ébullition sur le bain-marie durant 1 heure (2 heures dans le cas des produits à point de fusion élevé) en agitant de temps en temps.

Retirer le ballon du bain-marie, enlever le réfrigérant et transvaser le contenu du ballon dans une ampoule à décantation de 500 ml. Rincer le ballon avec, en tout, 100 ml d'eau qui sont versés dans l'ampoule ensuite, puis 100 ml d'oxyde d'éthyle (1) qui sont également reversés dans l'ampoule.

Boucher l'ampoule et secouer vigoureusement (*) pendant que le contenu est encore tiède. Placer l'ampoule verticale, le robinet en bas, jusqu'à ce que les deux couches de liquide se séparent limpides.

Soutirer la couche hydroalcoolique par le robinet, dans le ballon employé pour la saponification. Verser la couche éthérée par le haut de l'ampoule dans la deuxième ampoule à décantation contenant 40 ml d'eau.

(*) Environ vingt-cinq fois

Epuiser la solution hydroalcoolique de savon dans la première ampoule, deux fois encore, chaque fois par 100 ml d'oxyde d'éthyle (1) de la même manière.

Réunir les trois fractions éthérées dans la deuxième ampoule.

Si les fractions éthérées contiennent des matières solides en suspension, les filtrer et laver le filtre avec un peu d'oxyde d'éthyle (1).

Faire tourner l'ampoule contenant la solution éthérée et les 40 ml d'eau sur elle-même, sans secousse violente ; laisser se décanter et soutirer l'eau de lavage.

Si on soupçonne la présence de savons métalliques (existence de cendres, d'après la Norme NF T 60-209), ajouter alors à la solution éthérée 10 gouttes d'acide chlorhydrique (2) ; secouer vigoureusement (*), puis soutirer l'acide décanté. Reprendre alors la suite normale des opérations ci-dessous.

Laver la solution éthérée deux fois avec 40 ml d'eau en secouant vigoureusement (*). Puis laver successivement en secouant vigoureusement (*) avec 40 ml de solution aqueuse de potasse (6), 40 ml d'eau, 40 ml de solution aqueuse de potasse, 40 ml d'eau, 40 ml de solution aqueuse de potasse et 40 ml d'eau. Continuer les lavages avec 40 ml d'eau jusqu'à ce que les eaux de lavage ne se colorent plus en rose par addition de 5 gouttes de phénolphthaléine (8).

Transvaser la solution éthérée dans le ballon taré, évaporer complètement le solvant en chauffant au bain-marie. Ajouter 6 ml d'acétone (4) et les évaporer en s'aidant d'un léger courant d'air. Tenir le ballon obliquement presque entièrement immergé, et le faire tourner dans un bain-marie d'eau bouillante.

Terminer le séchage à 100°-105°C dans l'étuve et peser. Continuer le séchage jusqu'à ce que la perte de masse entre deux pesées consécutives soit inférieure à 2 mg. Quand la teneur en insaponifiable est très faible, il est intéressant, pour éviter des erreurs de pesées, de transvaser la solution contenant l'insaponifiable dans une capsule antigrimpante en verre mince en prenant toutes les précautions d'usage.

Dissoudre le contenu du ballon dans 20 ml d'alcool éthylique (3) fraîchement bouilli et neutralisé en présence de 5 gouttes de phénolphthaléine (8).

Titrer avec la solution alcoolique de potasse (7). Si le titrage ainsi obtenu excède 0,1 ml, le dosage doit être recommencé entièrement.

Lorsqu'on envisage d'utiliser ensuite ces insaponifiables pour doser et étudier les stéroïdes qu'ils contiennent, utiliser de l'oxyde d'éthyle exempt de peroxydes et éliminer les solvants à l'abri de l'air (vide ou gaz inerte).

II. METHODES NON NORMALISEES

Saponification à froid

La saponification de 5 g d'huile par 50 ml d'une solution éthanolique à 5 % de KOH est faite à température ordinaire sur agitateur magnétique et pendant 12 heures. Diluer le savon formé par 100 ml d'eau tiède avant d'extraire avec de l'oxyde d'éthyle, selon les indications de la méthode B.

(*) Environ vingt-cinq fois

Saponification rapide en présence de potasse concentrée

Peser 1 g d'huile dans un tube court rodé (L = 100 mm, ϕ 22 mm), dans lequel on a placé une sphère magnétique. Ajouter 4 ml d'éthanol absolu et 1 ml d'une solution aqueuse de potasse à 160 %. Plonger alors dans un bain-marie bouillant sur agitateur magnétique et saponifier sous azote 3 minutes en surmontant le tube d'un réfrigérant à reflux. Ajouter 20 ml d'eau distillée et transvaser quantitativement dans une ampoule à décantier. Extraire avec trois fois 25 ml d'éther éthylique. Laver par plusieurs portions d'eau jusqu'à disparition du virage de la phénol-phtaléine.

Extraction des savons de baryum

La solution hydroalcoolique de savon, après extraction par l'oxyde d'éthyle, est reprise par 100 ml d'une solution d'acétate de baryum à 20 % bouillante. Le précipité de savons de baryum est filtré puis séché à 60 °. Il est transvasé dans la cartouche d'un Soxhlet et est extrait pendant 4 heures par de l'acétone. Le résidu obtenu après distillation de l'acétone contient "l'insaponifiable résistant" et un peu de savons qui sont transformés en acides gras en ajoutant de l'acide chlorhydrique dilué au quart. On extrait par 3 fois 50 ml d'oxyde d'éthyle. Les extraits étherés sont lavés par la potasse aqueuse puis par l'eau. Le solvant est chassé et le résidu pesé.

Extraction des savons de potassium

L'empâtage de 5 g d'huile est réalisé dans un mortier de 250 cc de capacité avec 3 g de potasse auxquels on ajoute 1,5 ml d'eau. Mélanger jusqu'à formation du savon, puis porter 20 minutes le mortier et son pilon dans une étuve à 100°. Le savon sec ainsi obtenu est broyé avec 9 g de celite 545 et 1 g de chlorure de calcium anhydre. Placer la poudre dans un entonnoir muni d'une plaque en verre fritté et extraire 6 fois par 10 ml de benzène. Chasser le solvant sous azote.

Extraction liquide-liquide

1. Appareil de JALADE modifié UCCIANI

L'extracteur est rempli par un litre de solution savonneuse et le ballon vaporiseur contient 1500 cc d'éther. Le reflux ne doit donner qu'une goutte à goutte pour éviter l'insuffisance de décantation des extraits et un entraînement de savon. Les extraits étherés sont lavés par des portions de 100 ml d'eau et de potasse aqueuse à 3 %.

2. Appareil de WALBECQ

Les 150 ml de solution savonneuse résultant de la saponification de 5 g d'huile sont introduits dans l'extracteur, puis percolés par 300 ml d'éther éthylique. On reprend pour la suite les spécifications de la méthode B.

3. Appareil de WALBECQ que nous avons modifié

L'extracteur est muni d'un orifice inférieur supplémentaire dans lequel peut coulisser, par l'intermédiaire d'un bouchon ou d'un torion, une canne de verre comportant en son extrémité un robinet. Au cours de l'extraction, l'extrémité supérieure de la canne est au-dessus de la surface du liquide. Après décantation, on l'ajuste au niveau de séparation des deux phases et, en ouvrant le robinet, l'extrait étheré est récupéré sans que l'on soit obligé de vider complètement l'appareil.

4. Fonctionnement de l'extracteur de notre conception

Les robinets R' fermé et R ouvert, verser dans l'appareil 150 ml de solution à extraire qui se répartissent également entre décanteur et extracteur. Le contenu du ballon est porté à ébullition et les vapeurs d'éther, en pénétrant dans la solution savonneuse, d'abord la réchauffent puis vont se condenser sur les parois ou dans le réfrigérant. L'agitation s'accroît ainsi que le volume du liquide qui remplit complètement la communication médiane assurant la circulation vers le décanteur. Là, s'opère lentement la demixtion de l'éther formant une couche limpide, colorée au début. Le niveau s'élève progressivement jusqu'à l'orifice d'évacuation. La phase inférieure, de son côté, regagne la base de l'extracteur entraînée par le courant d'aspiration contrôlé par le robinet R. Elle rencontre du solvant frais et, avec l'amorce d'une nouvelle extraction, le cycle recommence. On stoppe l'opération après passage de la presque totalité du solvant.

L'appareil est conçu pour qu'au cours du fonctionnement la moitié du volume de liquide subisse l'extraction, alors que le reste occupe le décanteur. La forme de l'orifice inférieur, l'ouverture relative du robinet R, le débit de vapeur (fort au début puis très modéré) sont autant de facteurs agissant sur la vitesse des courants liquides et qui conditionnent une bonne décantation.

3. Extraction dans l'appareil de GRAIG

Avant l'extraction, nous avons équilibré le système solvant-solution savonneuse à température ambiante, afin d'éviter par la suite des distorsions dues à l'augmentation de volume de la phase inférieure. L'éther est ajouté peu à peu de façon à obtenir 1000 ml de phase supérieure.

Nous remplissons d'abord tous les tubes de phase inférieure. En principe, 23 transferts devraient suffire, pratiquement le liquide des deux premiers tubes a servi à mouiller les parois et il est bon de les compléter. Nous avons un volume de 575 ml contenant les savons résultant de la saponification de 19,16 g d'huile. Il est avantageux d'introduire la phase supérieure dans chaque tube à la pipette (20 ml) car la première décantation est toujours longue et l'on évite ainsi une perte de temps à chaque transfert de phase supérieure. Le dernier tube est en relation avec une fiole réceptrice dans laquelle nous collectons des fractions de plus en plus pauvres en matière extraite. Nous avons choisi un programme de 23 transferts de phase supérieure au niveau du tube 1, un plus grand nombre entraînant des distorsions trop importantes.

Préparation et utilisation des couches de silice alcaline

- Malaxer 30 g de silice G avec 65 ml d'une solution aqueuse de potasse 0,2 N. A l'aide d'un étaleur réglé pour la confection de couche de 250 μ d'épaisseur, couvrir 4 plaques de 20 x 20 que l'on abandonne à l'air 30 minutes avant de les placer 1 heure dans une étuve à 105°C. Après séchage et activation, laisser refroidir dans un exsiccateur.

- Sur l'une de ces plaques, nous avons déposé 2 bandes de 30 μ l d'insaponifiable en solution chloroformique à 4 % et des spots de 0,2 - 0,5 et 1 μ l d'acide oléique en solution chloroformique à 5 %. L'un des insaponifiables est préparé selon la méthode A de la Norme, l'autre suivant la méthode B. Le développement a lieu dans une cuve saturée du mélange hexane-oxyde d'éthyle (50:50).

- Nous avons réalisé les mêmes dépôts sur plaque de silice G normale.

Distillation moléculaire

Pour cet essai, nous avons utilisé le modèle micro de la firme SCHOTT, destiné à des séparations analytiques. Dans cet appareil, le liquide est réparti sur la surface d'évaporation par une spirale rotative en verre qui assure la formation d'un film très mince.

Conditions opératoires :

- . échantillon : huile de tournesol pression
- . pression résiduaire 5.10^{-4} mm
- . température du fluide calorifique : 220°C
- . rotation de la spirale : 40 tours/minute
- . admission de l'huile : 10 ml/heure

Nous avons passé 63 ml d'huile et obtenu deux fractions :

57 ml (fraction lourde)
3,5 ml (fraction légère)

Cristallisation fractionnée

Une portion de 100 g d'huile est mise en solution dans 1 litre d'acétone redistillée, puis placée 24 heures à -35°C pour une première cristallisation des glycérides. L'élimination du solvant de cristallisation est réalisée à l'aide d'un plongeur en verre fritté (Φ 65 mm, porosité 2) préalablement conditionné à la même température et relié à une fiole de 2 litres dans laquelle le vide est fait. Après essorage des cristaux, ceux-ci sont abandonnés à température ambiante et l'huile est à nouveau additionnée d'un litre d'acétone. A la suite d'une deuxième cristallisation et filtration, les filtrats sont réunis et l'acétone est éliminée par distillation. Le résidu est saponifié selon la méthode B et l'insaponifiable extrait.

En opérant sur 200 g, nous avons isolé respectivement 0,87 g d'insaponifiable de colza et 1,09 g d'insaponifiable de tournesol.

FRACTIONNEMENT CHROMATOGRAPHIQUE DE L'INSAPONIFIABLE

A. CHROMATOGRAPHIE SUR COLONNE

Préparation de l'alumine

L'alumine neutre PROLABO activée (modules AFNOR 18-23) est un adsorbant très actif dont le taux d'humidité est voisin de zéro. Il est nécessaire de l'hydrater afin d'obtenir des lots de différentes activités. Pour ce faire, nous avons eu recours à trois techniques :

. Hydratation par soufflage d'air humide

L'adsorbant est placé dans un buchner à plaque de verre fritté de grand diamètre. Celui-ci surmonte une fiole à vide de 1 litre contenant 250 ml d'eau à 60 °. Par la tubulure latérale, plonge dans l'eau un flexible de nylon relié à l'air comprimé. Le buchner est coiffé d'un verre de montre pour éviter les pertes de produit. Un léger barbotage suffit pour charger l'air en humidité et créer au sein de la couche d'alumine une turbulence favorable à son hydratation régulière et homogène. La prise de poids est contrôlée toutes les heures.

. Hydratation en enceinte saturée d'eau

Un cristallisateur de 190 mm de diamètre contenant 50 g d'alumine est abandonné dans un dessiccateur tapissé de papier filtre et contenant de l'eau. Le cristallisateur est posé à intervalles de 24 heures.

. Hydratation en milieu solvant

L'adsorbant est lavé par de l'acétone aqueuse (1:1). On porte ensuite à l'étuve à 105°C jusqu'à obtention du taux d'hydratation désiré.

Dans tous les cas, l'adsorbant ainsi préparé est abandonné 48 heures en flacon hermétiquement clos avant usage.

Mesure de l'activité

La prise de poids de l'alumine anhydre a été contrôlée régulièrement au cours de son hydratation et nous avons pu sélectionner des lots de différentes activités.

Méthode de HESSE

Dans un tube à hémolyse, peser rapidement 0,5 g d'adsorbant et recouvrir immédiatement avec 3 cc d'une solution 0,1 M d'azobenzène pur dans le cyclohexane. Agiter plusieurs fois. Au bout d'une heure, centrifuger 15 minutes et prélever 1 cc de surnageant à diluer 50 fois en fiole jaugée. Placer en cuve de 10 mm d'épaisseur avec, pour témoin, le cyclohexane. La mesure est effectuée à 445 nm. La perte en azobenzène est donnée par la formule

$$X = \frac{A}{m} (C_1 - C_2)$$

dans laquelle

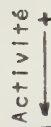
X = indice d'azobenzène qui est au coefficient 10^5 près la quantité de ce colorant fixé par gramme d'alumine

- a = volume de la solution colorée (en cc)
 m = masse d'adsorbant (en g)
 C_1 = concentration de départ du colorant dans la solution (en mole/cc)
 C_2 = concentration finale du colorant dans la solution (en mole/cc)

Nous avons dressé une droite d'étalonnage sur laquelle nous avons porté les concentrations finales (C_2) correspondant aux indices 28, 21, 18, 13 et 0.

Cette méthode a l'avantage d'être simple et plus rapide dans son exécution que la perte au feu.

Il y a correspondance entre les résultats de ces différentes méthodes de mesure d'activité.

	Quantité d'eau à ajouter %	Indice Brockmann	Indice d'azobenzène
Activité 	0	I	26
	3	II	21
	6	III	18
	10	IV	13
	15	V	0

Chromatographie de l'insaponifiable sur colonne d'alumine

Nous avons utilisé des conditions opératoires semblables pour les essais avec insaponifiables synthétiques et naturels. La colonne (L 450 mm, ϕ 25 mm) contient 100 g d'alumine (indice azobenzène 12) et est en relation avec un collecteur de fractions ERAL réglé de telle sorte que les volumes délivrés soient de 10 ml par tube. Pour éviter la détérioration du haut de colonne, l'adsorbant est coiffé d'une couche de 20 mm de sulfate de sodium anhydre qui retiendra aussi les dernières traces d'humidité. L'échantillon (environ 1 g dans chaque cas) est dissout dans le minimum d'hexane, puis chargé à l'aide d'un entonnoir à longue tige. Le début est fixé à 4 ml/minute. Le contenu des tubes est évaporé sous courant d'azote, puis pesé. La pureté des différentes fractions est contrôlée par C.C.M. de silice G avec, selon le cas, comme éluant : cyclohexane puis hexane-éther éthylique (80:20) et (50:50).

Chromatographie préparative des stérols sur colonne d'alumine

L'huile de tournesol (500 g) a été transestérifiée par le méthanol en présence de potasse méthanolique N. Les esters, après extraction, sont séchés puis mis en solution à 25 % dans l'hexane. La solution est appliquée à une colonne contenant 1 kg d'alumine hydratée à 15 % et, après percolation, la colonne est lavée par de l'éther pur par fractions de 500 cc. La quatrième fraction abandonne 2,27 g d'un solide blanc qui est recristallisé dans le méthanol. Nous avons récupéré 1,82 g d'un produit donnant une seule tache par C.C.M. s'identifiant avec celle des stérols totaux d'arachide et de colza.

Chromatographie de l'insaponifiable sur colonne de silice

Une colonne de verre (L 450 mm, ϕ 25 mm) est obstruée dans sa partie inférieure par un tampon de coton préalablement dégraissé. Introduire 30 g de silice Mallinckrodt 100 Mesh en suspension dans l'hexane. L'adsorbant est tassé par vibration (vibreux électrique), alors que le surplus de solvant est éliminé. L'insaponifiable (environ 500 mg) est dissout dans le minimum d'hexane puis appliqué en tête de colonne à l'aide d'une pipette bâton. Recueillir par fractions de 10 ml à l'aide d'un collecteur de fractions en éluant avec un mélange hexane-oxyde d'éthyle (95:5). Après évaporation partielle des fractions, chacune est analysée par C.C.M.

B. CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE

Dépôt des échantillons

Les substances à chromatographier, en solution à 10 % dans le chloroforme, sont déposées en spots ou en bande de 15 mm du bord inférieur de la plaque à l'aide d'une microsiringue HAMILTON de 50 μ l de capacité.

Développement

- En grande cuve

Les plaques de 20 x 40, développées verticalement, sont placées dans une cuve SHANDON (50 x 20 x 57) tapissée de papier filtre et contenant 1000 ml du mélange éluant.

- A front perdu

Pour faciliter la migration du solvant, la plaque est prolongée par une feuille de filtre de 18 x 20, dont l'un des bords est appliqué sur l'adsorbant grâce à un barreau de verre maintenu latéralement par deux pinces. Le filtre, recourbé vers le bas, ne doit pas être en contact ni avec le solvant ni avec la paroi de la cuve.

- Multiple

Pour une étude analytique, la plaque est divisée en autant de bandes que le nombre de développements prévus. Chacune reçoit des dépôts identiques (échantillon et étalon). Après migration, la plaque est retirée de la cuve, séchée à 70°C quelques minutes, puis une bande est mise "hors circuit" par grattage soigneux de sa partie inférieure avant un nouveau développement. De cette façon, les différentes bandes subiront un, deux, trois développements, etc...

- A gradient de concentration

La cuve est surmontée d'un couvercle présentant un orifice médian en relation avec une ampoule contenant 80 ml d'éther. Par l'intermédiaire d'un tube de verre coudé, le liquide arrive directement au fond de la cuve dans laquelle on a placé 100 ml d'un mélange hexane-oxyde d'éthyle (90:10) et un barreau magnétique. L'écoulement de l'ampoule est réglé de façon à la vider régulièrement de son contenu en 1/2 heure, temps approximativement nécessaire pour développer une plaque de 20 x 20 en atmosphère saturée. Au temps 0, introduire la plaque dans la cuve, verser l'éther dans l'ampoule et mettre l'agitateur en marche. En fin d'opération, le mélange aura pour composition : hexane-oxyde d'éthyle (1:1).

- En chambre de volume réduit

Les plaques de 20 x 20 sont couvertes d'une contreplaque de 18 x 20 séparée de la couche adsorbante par l'épaisseur d'un tasseau (conducteur électrique, bifil, plat) disposé sur trois côtés, le quatrième plongeant dans le solvant. Le développement se fait en cuve normale, non saturée.

Pour les plaques de 40 x 20, nous avons construit un dispositif horizontal s'inspirant de l'ensemble BN DESAGA avec un socle en bois et une cuve de refroidissement ainsi que l'aiguette à solvant en zinc. L'adsorbant est mis en relation avec le solvant par l'intermédiaire d'une languette de papier filtre maintenue en position par la contre-plaque. Il est nécessaire, pour un fractionnement correct, de créer un gradient de température entre les deux parois de cette cuve étroite, résultat obtenu par circulation d'eau froide dans le bloc inférieur et chauffage de la contre-plaque par rayonnement infrarouge (lampe de 150 watts à 50 cm).

Révélation des bandes

Sur plaques analytiques, le réactif minéralisant (H_2SO_4 $\frac{1}{2}$ concentré) est pulvérisé à l'aide d'un nébulisateur, sous hotte. La révélation est faite par chauffage de 10 minutes à 1 heure dans une étuve à 130 ° C.

Pour les plaques préparatives, nous avons utilisé la dichlorofluorescéine (solution alcoolique à 0,1 %) ou la rhodamine 6 G (solution aqueuse à 0,05 %) mais, vu les difficultés de repérage des bandes, nous procédions souvent autrement : la majeure partie de la plaque est recouverte d'une contre-plaque médiane, seules deux bandes latérales peu larges (2 cm) restent apparentes. L'acide sulfurique est pulvérisé et les zones minéralisées sont révélées à l'aide d'un pistolet à air chaud ou avec le brûleur électrique d'HOFFMANN. On peut ainsi délimiter les bandes sur la plaque préparative en s'assurant de la régularité de la migration par examen de la plaque sous lumière UV. La forme des bandes naturellement fluorescentes renseigne à ce sujet.

Identification des bandes

Les différents réactifs de pulvérisation ont été préparés selon STAHL (69). Nous avons employé l'acide sulfurique, le trichlorure et le pentachlorure d'antimoine, la dinitrophenylhydrazine, l'iode, le réactif d'EMMERIE-ENGEL, le bleu de méthylène réduit, l'acide phosphomolybdique, la lumière UV. Les étalons ont été déposés en solution chloroformique à 10 %.

Récupération des substances séparées

Après détermination, les bandes d'adsorbant sont détachées de la plaque à l'aide d'une languette en téflon (bonne adhésion à la surface du verre, inertie chimique). Pour désorber les substances fixées, nous avons procédé de trois façons différentes :

- Par microextracteur

La cartouche centrale est constituée par un tube à hémolyse à bord supérieur évasé et dont le fond est en partie ouvert. Placer successivement une bourre de coton dégraissé puis la poudre à extraire. Une allonge à trois pointes maintient le corps de cet extracteur entre un réfrigérant et un ballon de 100 ml contenant environ 25 ml d'éther. L'extraction est arrêtée au bout d'une heure.

- Sur microcolonne

L'adsorbant, détaché de la plaque, est finalement écrasé avec un agitateur en verre puis placé dans une colonne de 10 mm de diamètre et 150 mm de longueur. On extrait par portions de 1 ml d'éther en versant jusqu'à 10 ml de solvant. Un léger vide peut faciliter l'écoulement.

- Par solvant à chaud

L'adsorbant est placé dans un erlen de 50 ml avec 10 ml de chloroforme. Chauffer tout en agitant sur microbrûleur ou brûleur électrique. Au bout de 10 minutes d'ébullition, filtrer sur coton dégraissé.

Densitométrie

Les plaques de silice G (20 x 20) de 250 μ d'épaisseur sont préalablement débarrassées des impuretés par lavage à l'éther éthylique. Les étalons sont mis en solution dans le chloroforme à raison de 1 mg/ml/ Il en est de même pour l'insaponifiable. On dépose successivement en bandes de 15 mm de longueur : 5, 10, 15, 20 μ g d'insaponifiable.

La plaque est développée dans une cuve contenant 100 ml d'un mélange hexane-oxyde d'éthyle (1:1). Ensuite, on la sèche avant de la replonger dans une cuve contenant 30 ml de chlorure de sulfuryle répartis en trois cristallisoirs. Elle y séjourne exactement 5 minutes. Elle est ensuite exposée 1 minute à la vapeur d'un bain-marie bouillant. On la place 30 minutes dans une étuve à 180°. La lecture de la plaque est faite à l'aide d'un photomètre enregistreur VERNON. Comme référence, nous avons construit des courbes d'étalonnage $S = f(q)$ (figure 12).

HYDROCARBURESChromatographie sur plaque des hydrocarbures totaux

Les hydrocarbures totaux sont rechromatographiés préparativement sur plaque de silice G avec le cyclohexane comme solvant de développement. Après examen sous lumière ultra-violette, la bande représentative des hydrocarbures paraffiniques est récupérée puis extraite.

Dosage du squalène selon la méthode AOAC

L'utilisation du bromosulfate de pyridine facilite la fixation d'iode sur le squalène. La composition du réactif et le mode opératoire sont normalisés (102). Connaissant l'indice d'iode théorique de cette fraction ($I_i = 370$), on établit l'équivalence iode/squalène et thiosulfate/squalène. A 1 ml de solution 0,05 N de thiosulfate correspond 1,71 mg de squalène.

Chromatographie en phase gazeuse des hydrocarbures paraffiniques

Les paraffines sont en solution à 20 % dans l'hexane pur.

1. Isotherme

Appareil GIRDEL FS 75
Colonne 2 mètres, ϕ int. 2 mm, 3% SE 30 sur Gas Chrom Q 100-120 M
 $\theta_c = 210^\circ\text{C}$ $\theta_{id} = 260^\circ$ $N_2 = 1 \text{ B}$ $H_2 = 20 \text{ ml/min}$
air = 400 ml/min

On injecte de 0,2 à 0,5 μl de la solution d'hydrocarbures.

2. Programmée

La colonne est identique mais la température du four est modulée par le programmeur GIRDEL.

$\theta_{initiale} = 150^\circ\text{C}$ $\theta_{finale} = 290^\circ$
Vitesse de programmation : 2°C/min

Le conditionnement à la température inférieure doit être aussi bref que possible car des constituants provenant de la décomposition des pastilles d'injection sont alors piégés et réapparaissent à la montée en température sous forme de pics plus ou moins importants et non identifiables. L'utilisation de pastilles avec pellicule de téflon évite cet inconvénient.

Dosage du squalène

L'insaponifiable de 5 g d'huile est chromatographié préparativement sur plaque de silice préalablement lavée à l'éther. Développer avec le mélange hexane-oxyde d'éthyle (70:30). La dichlorofluoresceïne a été incorporée lors de la confection des plaques (1 ml de solution alcoolique à 0,1 % dans 60 ml d'eau) et l'examen sous lumière UV permet de délimiter la bande des hydrocarbures. La gratter. La poudre est placée dans une microcolonne puis extraite rapidement par plusieurs portions de 1 ml d'éther éthylique. Récupérer dans un tube contenant 0,1 ml d'une solution à 2 mg de squalane/ml. Chasser la majeure partie du solvant par l'azote, reprendre par quelques gouttes d'hexane puis injecter dans l'appareil précédemment utilisé, dont la température du four est fixée à 230°C .

ALCOOLS

Microacétylation des alcools

A quelques milligrammes de stérols, ajouter 0,1 ml d'anhydride acétique, puis 0,1 ml de pyridine. Porter 1 heure à 70°C. Verser 2 ml d'eau glacée et 5 ml d'hexane. Agiter dans une petite ampoule de 20 ml (QUICKFIT). Éliminer l'eau. Laver par 5 ml d'HCl N/10, par 5 ml d'eau, par 5 ml de NaHCO₃ à 1 %, puis 5 ml d'eau. Sécher sur Na₂SO₄, filtrer, puis chasser l'hexane.

Epoxydation des acétates d'alcools totaux

Les alcools totaux après acétylation (cf. stérols) sont epoxydés par une solution d'acide paranitroperbenzoïque à 1% dans l'éther éthylique en tube capillaire (mettre sensiblement autant d'oxydant que d'alcool). Laisser en contact 5 heures, puis chasser la presque totalité de l'éther. Déposer sur plaque de silice G sous forme de bandes, puis développer par le mélange cyclohexane-acétate d'éthyle (85:15).

Chromatographie en phase gazeuse des alcools

Appareil GIRDEL FS 75
Colonne 3 % SE 30 sur Gas chrom Q 80-100 Mesh
L = 2 mètres, ϕ int. 2 mm
Pression d'entrée 1 B

Les alcools, sur colonne suffisamment maturée, sont chromatographiés sous forme libre à des températures comprises entre 220 (alcools aliphatiques) et 260° (alcools triterpéniques).

Saponification de la cire de tournesol et chromatographie des alcools gras

Un échantillon de cire purifiée de tournesol (5 g) est saponifié par 50 ml de KOH alcoolique 2 N en présence de 20 ml d'essence E pendant 6 heures. L'insaponifiable est extrait à chaud par l'hexane, puis récupéré. La chromatographie sur plaque de silice G (dev. benzène, cuve à 45°C) montre qu'il est essentiellement constitué d'alcools gras dont la composition est déterminée par chromatographie en phase gazeuse.

STEROLS

Microhydrogénation de l'acétate de stigmasténol

2 mg d'acétate de stigmasténol sont dissouts dans 5 ml d'acétate d'éthyle et hydrogénés pendant 3 heures à la pression atmosphérique en présence de 10 mg de charbon palladié à 5 % de palladium. Après filtration, le solvant est évaporé et le résidu repris par le chloroforme est injecté dans le chromatographe en phase gazeuse.

Microacétylation des stérols totaux (cf. alcools)

Formation de silyléthers

A 10 mg de stérols, ajouter, dans l'ordre, 0,5 ml de pyridine, 100 μ l d'hexamethyldisilazane et 40 μ l de trimethylchlorosilane. La réaction est complète au bout de 5 minutes.

Chromatographie sur couche de silice G des stérols de tournesol

Les stérols totaux de tournesol en solution à 10 % dans le chloroforme ont été déposés préparativement à raison de 20 mg par plaque. Les plaques sont introduites par deux dans une cuve saturée contenant 100 ml de mélange hexane-oxyde d'éthyle (1/1). Après migration, les plaques sont retirées puis séchées 10 minutes à 70°C. Refroidies, elles sont à nouveau remises en cuve pour une deuxième migration. Les Δ^7 -sténols sont délimités par minéralisation latérale, puis récupérés.

Spectrométrie de masse

Peu de détails opératoires nous ont été communiqués au sujet de cette détermination faite hors des laboratoires de l'ITERG. L'appareil utilisé est un MS 9 de la Firme A.E.I. (Manchester). Température d'introduction de l'échantillon : 220°C.

Chromatographie sur couche de silice G imprégnée de nitrate d'argent

Les plaques sont confectionnées à l'aide du mélange suivant : silice G:30 g, solution de nitrate d'argent à 5 % : 60 ml. Elles sont activées 1 heure à 110°C. Les acétates en solution dans le chloroforme sont déposés à raison de 100 à 200 μ g par spot. Développer par le chloroforme, à l'obscurité, Révéler en pulvérisant de l'acide sulfurique 1/2 concentré et minéraliser en étuve à 130°C.

Chromatographie sur couche de Kieselguhr imprégnée d'undécane

En malaxant 30 g de Kieselguhr et 60 ml d'eau, préparer 4 plaques de 20 X 20 et de 0,25 mm d'épaisseur. Sécher et activer 1 heure à l'étuve à 110°C. L'imprégnation est réalisée en plongeant 15 secondes les plaques une à une dans une cuve contenant une solution à 10 % d'undécane (Fluka 94010) dans l'éther de pétrole. Abandonner 80 minutes à l'air et détacher l'adsorbant après avoir délimité des secteurs hexagonaux réguliers (côté = 18 mm) au bas des plaques, de façon à effectuer les dépôts sur des bandes de faible largeur (2 à 3 mm, voir figure 24, page 42). Déposer 40 à 60 μ g de chaque acétate. Développer par un mélange acide acétique-acétonitrile (1:3) en cuve saturée. Passer 45 minutes à l'étuve à 110°. Révéler par l'acide phosphomolybdique à 20 % dans l'éthanol.

Chromatographie sur couche de magnésie

Les plaques sont préparées en mélangeant, dans l'ordre, 15 g d'oxyde de magnésium (Merck 5865), 5 g d'alumine G, 1 g de plâtre de Paris et 80 ml d'eau. Etaler en couche de 0,3 mm sur 3 plaques de 20 x 20. Laisser sécher à l'air, l'activité maximum est atteinte au bout de 48 heures. Comme précédemment, les acétates sont déposés en bandes étroites. Développer par le mélange hexane-oxyde d'éthyle (95:5). Révéler par la solution éthanolique d'acide phosphomolybdique.

Chromatographie en phase gazeuse des stérols, de leurs acétates et de leurs triméthylsilyléthers

Appareil GIRDEL FS 75

Colonne 2 mètres, 3 % SE 30 sur Gas Chrom Q 100-120 M

θ colonne : 240°C θ injecteur-détecteur : 260°C

Perte de charge N2 : 1 B

Maturation de la colonne : la colonne est portée de 100°C à 300°C par augmentation progressive de la température (50°C par 24 heures). Après avoir repris la température de travail (240°C), injecter plusieurs fois à intervalle de 1 heure, 1 μ l de solution à 10 % d'insaponifiable total dans le chloroforme, puis abandonner une nuit à 270°C. Réafficher la température four à 240° si la colonne est convenablement maturée, une faible compensation est nécessaire. Les stérols et leurs acétates sont injectés en solution chloroformique (10 à 20 %). Volume de l'injection 0,1 à 0,2 μ l. Atténuation 32 ou 16.

METHYLSTEROLS

Chromatographie sur colonne de silice de l'insaponifiable de colza

La colonne ($\varnothing$ 20 mm, L 350 mm) contient 30 g de silice Mallinckrodt 100 mesh dans l'hexane. Un gramme d'insaponifiable en solution dans l'hexane est appliqué puis élué par un mélange hexane-oxyde d'éthyle (95:5). On collecte par fractions de 10 ml qui sont ensuite concentrées et dont la pureté est contrôlée par C.C.M.

Chromatographie analytique de l'insaponifiable de tournesol

La plaque de silice G a été partagée en 4 bandes, chacune d'entre elles ayant reçu un dépôt d'insaponifiable et de substance de référence. Les développements se font par un mélange hexane-acétate d'éthyle (95:5) et, après chaque migration, la plaque est retirée de la cuve, séchée 10 minutes à 70°. Par grattage de la partie inférieure, les bandes sont l'une après l'autre exclues de la chromatographie qui est répétée 4 fois. La plaque est révélée par une solution sulfurique à 50 %, puis minéralisée à l'étuve à 130°C.

Chromatographie préparative

Sur plaque de silice G de 20 x 20, déposer 20 mg d'insaponifiable en solution chloroformique à 10 %. Développer 4 fois de suite, avec séchage intermédiaire, par le mélange précédemment utilisé. Un résultat acceptable peut déjà être obtenu par double développement dans le mélange hexane-acétate d'éthyle (85:15). La bande correspondant aux méthylstérois est grattée, puis extraite par le chloroforme.

Réaction de LIEBERMANN-BUCHARD

La réaction est faite avec moins d'un milligramme de stérois en solution chloroformique. Après addition de l'anhydride acétique et de l'acide sulfurique, on suit le développement de la coloration au spectrophotomètre à 620 nm. On construit la courbe de cinétique.

Chromatographie en phase gazeuse (cf. stérois)

Spectrométrie de masse (cf. stérois)

CETONES TERPENIQUES

Isolément et purification de la fraction cétonique

Sur colonne d'alumine (cf. 2ème partie, p. 99) 650 mg d'insaponifiable de colza sont appliqués. Les tubes 30 à 35 sont collectés, le solvant est évaporé et le résidu mis en solution chloroformique à 10 %. Cette solution est déposée préparativement sur plaque de silice G développée par le mélange hexane-oxyde d'éthyle (70:30). Après localisation de la fraction cétonique, on extrait 3,7 mg de substance.

Microréactions

1. Oxydation

Un spot de substance est déposé sur la plaque puis recouvert d'une goutte de solution d'anhydride chromique à 20 % dans l'acide acétique. On sèche à l'azote avant développement. La réaction est faite aussi en tube capillaire pour la chro-

matographie en phase gazeuse. Le produit après transformation est extrait par quelques gouttes d'hexane.

2. Réduction

Dans un tube capillaire, placer moins d'un milligramme de substance et quelques gouttes d'une solution alcoolique à 10 % de borohydrure de sodium. Attendre 2 ou 3 heures.

Chromatographie sur plaque et en phase gazeuse

- Les plaques d'alumine G sont préparées selon les indications habituelles. Elles sont développées par le mélange hexane-benzène-éthanol (50:50:5).

- La chromatographie en phase gazeuse est effectuée dans les mêmes conditions que pour l'analyse des alcools triterpéniques (θ four = 250°C)

PIGMENTS

Solvants

. Ether éthylique. L'éther pur est débarrassé de ses peroxydes par agitation avec une solution de sulfate ferreux, lavage à l'eau puis séchage sur sulfate de sodium anhydre. Distiller puis conserver en flacons teintés avec quelques fragments de sodium métallique.

. Ether de pétrole 30-70° -hexane - Distiller sur hydruure de lithium - aluminium (2 g/litre).

. Alcool éthylique absolu sans carbonyle (voir tocophérols).

Teneur en caroténoïdes totaux et en chlorophylle

- Les huiles de soja (0,604 g), de colza (0,518 g) et l'insaponifiable de 23 g d'huile de tournesol sont mis en solution dans l'hexane en fioles de 10 ml. L'absorption des solutions placées dans des cuves de 1 cm d'épaisseur est mesurée entre 350 et 500 nm à l'aide d'un spectrophotomètre enregistreur BECKMAN DK 2 A. On évalue la teneur en caroténoïdes totaux, exprimée en β -carotène, en prenant E_{440}^1 carotène = 2505 dans l'éther de pétrole.

- Les huiles de colza et de soja sont versées pures dans des cuves de 1 cm avec pour témoin du tétrachlorure de carbone. Décrire le spectre entre 750 et 550 nm. L'huile de tournesol est placée en cuve de 10 cm. Mesurer les absorptions à 645,5 nm, 656 nm, 664, 668 nm et utiliser pour le calcul les formules suivantes (32) :

chlorophylle A = $0,38 A_{645,5} - 23,76 A_{656} + 72,5 A_{664} - 52,34 A_{668}$
(en ppm)

Chlorophylle B = $34,75 \text{ " } - 28,83 \text{ " } + 18,20 \text{ " } - 9,33 \text{ "}$
(en ppm)

Pheophytine A = $3,96 \text{ " } - 0,12 \text{ " } - 59,46 \text{ " } + 67,00 \text{ "}$
(en ppm)

Pheophytine B = $-40,52 \text{ " } + 92,71 \text{ " } - 81,78 \text{ " } + 38,10 \text{ "}$
(en ppm)

Fractionnement des pigments

1. Colonne mixte magnésie-sucrose

Prendre une colonne de 50 cm de hauteur et 18 mm de diamètre intérieur, dont la partie inférieure comporte un double rodage et le robinet. On peut, de cette façon, ouvrir la colonne en fin d'opération et sortir le cylindre d'adsorbant. Déposer au fond de la colonne un tampon de laine de verre. Verser un peu d'hexane puis la magnésie (Merk 5865) en suspension dans ce solvant, de façon à obtenir après tassement (vibreux électrique) une couche de 6 cm de hauteur. Procéder de même pour le sucre préalablement broyé et tamisé (AFNOR 18-20) qui occupera une hauteur de 11 cm. La colonne ainsi préparée reçoit une solution de 10 g d'huile dans 100 ml d'hexane. Après élution, la colonne est lavée par 100 ml d'hexane et une fois sec l'adsorbant est retiré. L'examen en lumière UV permet de déceler la bande des chlorophylles qui sont extraites à l'éther éthylique. L'adsorbant ayant retenu les xanthophylles est additionné de 20 ml d'éthanol et le mélange est centrifugé. On prélève 1 ml de surnageant que l'on place dans une fiole de 10 et l'absorption est mesurée ainsi que celle de la fraction hydrocarbure diluée par les 100 ml d'hexane.

2. Colonne magnésie-hyflosupercel

Bien mélanger des quantités équivalentes (5 g) de magnésie et d'hyflosupercel dans 100 ml d'hexane. Verser dans une colonne de 18 mm de diamètre et de 35 cm de hauteur. L'insaponifiable de 23 g d'huile de tournesol est mis en solution dans le minimum d'hexane, puis appliqué à cette colonne. Après élution puis lavage par l'hexane, l'adsorbant est extrait comme précédemment. La solution obtenue n'absorbe pratiquement pas. L'éluat est concentré à 10 ml sous azote avant la spectrophotométrie.

Chromatographie sur couche mince

- Les plaques de silice G sont préparées dans les conditions habituelles.

- Les plaques de chaux + silice sont confectionnées à l'aide du mélange suivant : 24 g d'hydroxyde de calcium pur tamisé, 4 g de silice G, 40 ml d'eau.

Abandonner 24 heures à température ambiante avant utilisation.

Les insaponifiables sont mis en solution dans le chloroforme (10 %). Le β carotène témoin est dissout dans l'hexane (1/2000).

TOCOPHEROLS

Matière d'oeuvre et référence

Les huiles de soja, colza et tournesol, sont de qualité brute. L'huile de palme a été utilisée comme source des quatre tocotriénols naturels.

Nous disposions d'un concentrat de tocophérols à partir duquel nous avons isolé les variétés γ et δ et d'un échantillon d' α -tocophérol pur. Une huile d'arachide commerciale a été testée seule puis en mélange avec 10 % d'huile de soja raffinée.

Solvants

L'alcool éthylique absolu est débarrassé des traces de composés carbonylés par ébullition en présence de permanganate de potassium et potasse (respectivement 1 et 2 g/l), puis distillation.

A. Méthodes classiques

Nous nous sommes référés aux modes opératoires originaux figurant aussi dans l'ouvrage de J.P.WOLFF (32). Mentionnons seulement que la saponification est faite sous azote en présence de pyrogallol dans un tube rodé (200 mm de 0 et 150 mm de haut) surmonté d'un réfrigérant dont l'orifice central laisse passage à une longue pipette d'arrivée d'azote. L'agitation vive du milieu est assurée par une sphère magnétique. Les mesures colorimétriques sont faites à 520 nm 2 minutes après mélange des réactifs et sont reportées sur une courbe d'étalonnage construite avec l' α -tocophérol pur. Dans le cas de l'huile de soja, on attend 4 minutes avant d'effectuer la mesure.

B. Mise au point d'un dosage direct des tocophérols libresMatériel

- . nécessaire pour la confection, le développement et la révélation des plaques de CCM
- . 1 microseringue Hamilton de 50 μ l
- . 1 gabarit de matière plastique guide-dépôt
- . colonnes de 10 mm de $\varnothing$ et 120 mm de haut
- . fioles jaugées 10, 20 et 50 ml
- . pipette-bâton de 1 et 5 ml graduées au 1/10
- . tubes bouchés de 10 ml de capacité
- . spectrophotomètre visible et cuves de verre de 1 cm d'épaisseur

Réactifs

- . gel de silice G
- . acide phosphomolybdique - solution dans l'éthanol (20 g/100 ml)
- . éthanol absolu distillé sur KMnO_4 et KOH
- . chlorure ferrique $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ - solution $1 \cdot 10^{-3}$ M dans l'éthanol
- . bathophénanthroline - solution $6 \cdot 10^{-3}$ M dans l'éthanol (20 mg dans 10 ml d'alcool)
- . acide orthophosphorique - solution $4 \cdot 10^{-2}$ M dans l'éthanol
- . benzène RP
- . éther de pétrole (40-60°) sans peroxyde
- . éther éthylique

Mode opératoireChromatographie

Peser 2 g d'huile dans une fiole jaugée de 10 ml et compléter avec du benzène. La plaque de silice de 0,5 mm d'épaisseur est divisée en deux zones représentant 2/3 et 1/3 de la surface utilisable (compte tenu des traits latéraux pour éviter les effets de bord). La plus grande à gauche est destinée à la migration de l'échantillon déposé sous forme d'une bande continue de 90 mm de longueur et à celle de l'étalon ponctuel espacé de 15 mm sur la droite (figure 44). La partie droite ne reçoit pas de dépôt, elle servira au prélèvement du blanc à la hauteur de la bande échantillon détachée après élution. Déposer 200 μ l de la solution d'huile à 10 % dans le benzène. La cuve de développement, tapissée intérieurement sur 3 faces de papier filtre, est saturée par 100 ml du mélange éther de pétrole-éther éthylique (70:30). La plaque est placée dans la cuve et lorsque le front du solvant est à 1 cm du bord supérieur, la retirer. La couvrir immédiatement des 2 contre-plaques et pulvériser la solution d'acide phosphomolybdique. Des taches bleues apparaissent de suite à froid et permettent de délimiter les

bandes à gratter de part et d'autre (le blanc est détaché sur une plus grande largeur pour que la quantité de silice prélevée soit à peu près équivalente à celle de l'échantillon). Découvrir la plaque et récupérer rapidement par grattage la bande I correspondant aux tocophérols. La poudre encore imprégnée d'éluant (ce qui protège les tocophérols de l'oxydation) est introduite dans la colonne dont l'extrémité inférieure est obstruée par une bourre de coton dégraissé à l'éther. Désorber par fractions de 1 ml d'éther éthylique de façon à récupérer 5 ml de solvant dans les tubes servant à la colorimétrie. Chasser le solvant par un courant d'azote au bain-marie tiède.

Récupérer de même la bande II correspondant aux polymères.

Colorimétrie

Pour chaque tube, reprendre le résidu par 3,5 ml d'éthanol, puis ajouter dans l'ordre 0,5 ml de solution de bathophénanthroline, puis 0,5 ml de solution de chlorure ferrique. Agiter et attendre 1 minute. Verser alors 0,5 ml de la solution d'acide phosphorique et agiter de nouveau. La colorimétrie est faite à 534 nm et les valeurs reportées sur la courbe d'étalonnage. Le blanc ne doit pas donner de coloration rose appréciable.

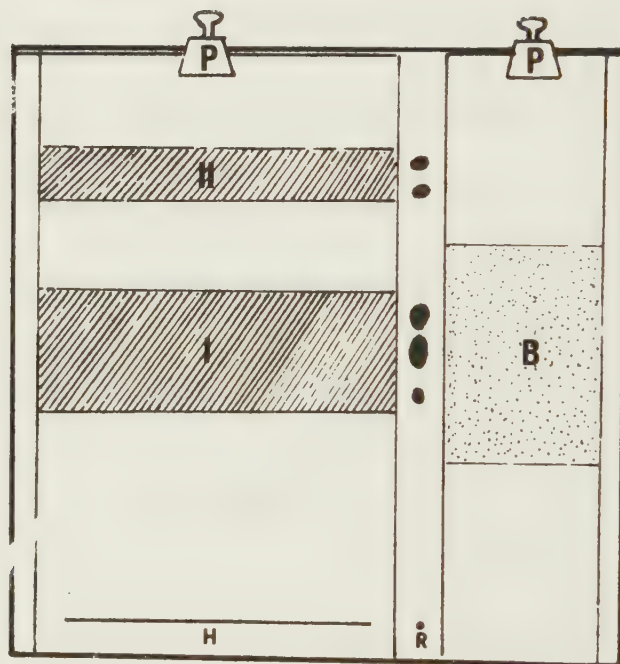


Figure 44

Dosage des tocophérols totaux par C.C.M.

- I - Tocophérols libres
- II - Polymères
- B - Essai de référence
- H - Huile en solution dans l'hexane
- R - Tocophérols de référence

Chromatographie sur couche mince

Matériel

- . nécessaire pour la confection et le développement des plaques de CCM 20 x 20
- . étuve réglable à 110 et 130 °
- . microseringue de 50 μ l

Réactifs

- . benzène RP
- . éther de pétrole (40-60°) sans peroxyde
- . éther éthylique "
- . éther isopropylique "
- . gel de silice G
- . solution à 0,2 % de dichlorofluorescéine dans l'éthanol (introduire 1 ml dans 60 ml d'eau).

Mode opératoire

- Obtention de tocophérols purs

Nous avons déposé préparativement 100 mg de concentrat en solution benzénique à 10 % sur plaque de silice G de 0,5 mm d'épaisseur contenant déjà l'indicateur (dichlorofluorescéine).

Le développement est fait avec le système éther de pétrole-éther éthylique (70:30). Les bandes incomplètement séparées sont déjà visibles en lumière naturelle et, après grattage, elles sont extraites ensemble par l'éther éthylique. La quantité de tocophérols totaux ainsi récupérée est de 45,6 mg. (Le concentrat est donné pour contenir 50 % de tocophérols). Une deuxième chromatographie préparative sur plaque de silice G de 0,25 mm prenant le chloroforme comme éluant, permet de bien séparer les variétés α , γ et δ que contient l'extrait. Les bandes délimitées sont alors traitées individuellement.

- Analyse qualitative et quantitative des tocophérols individuels

. Les insaponifiables des trois huiles, préparés comme il a été indiqué, sont mis en solution à raison de 2 % dans le benzène. Sur plaque de silice activée 1 heure à 110°C, on dépose 50 μ l de chaque solution sous forme d'une bande de 20 mm de long. Des spots de référence (α , γ et δ -tocophérols) déposés latéralement facilitent l'identification. Développer à l'aide du système éther de pétrole-éther éthylique (70:30).

. Pour le développement à deux dimensions, déposer un spot de 50 μ g d'insaponifiable en solution benzénique (en s'aidant d'un léger courant d'azote pour évaporer à mesure le solvant) et effectuer la première migration dans une cuve saturée de chloroforme. La plaque est retirée, séchée sous courant d'azote et tournée à 90 ° avant d'être plongée dans une autre cuve contenant le mélange éther de pétrole- éther isopropylique (80:20).

. L'insaponifiable est mis en solution benzénique et déposé sur couche de silice G activée 2 heures à 130°C.

. La chromatographie préparative des tocophérols individuels est réalisée en déposant 25 μ l de solution benzénique à 10 % d'insaponifiable. Développer à l'aide du système éther de pétrole-éther éthylique (70:30). Extraire chaque bande par l'éther éthylique puis éliminer le solvant sous azote. Effectuer la colorimétrie et les densités optiques lues sont reportées sur les droites d'étalonnage.

Chromatographie en phase gazeuse

Matériel

- . chromatographe en phase gazeuse GIRDEL 75 FS
- . colonne 2 mètres inox $\varnothing$ int. 2 mm Gas chrom Q 80-100 M Imprégnée à 3 % SE 30
- . 1 seringue 1 μ l
- . 1 seringue 100 μ l
- . 1 pipette de 1 ml au 1/100
- . tubes à hémolyse

Réactifs

- . pyridine anhydre
- . hexaméthylidisilazane
- . triméthylchlorosilane
- . solution de squalane dans l'éther éthylique (1 mg/ml)

Mode opératoire

Les tocophérols totaux contenus dans 1 g d'huile sont isolés par chromatographie préparative de l'insaponifiable (II - 1ère partie, page 85). A l'extrait sec, on ajoute 50 μ l de la solution de squalane qui servira d'étalon. L'éther est chassé par un courant d'azote.

1. Préparation des silyléthers. Le réactif est préparé de la façon suivante : dans un tube à hémolyse, verser dans l'ordre 0,5 ml de pyridine, 0,45 ml hexaméthylidisilazane, 0,3 ml de triméthylchlorosilane. Boucher et attendre 15 minutes la complète décantation du précipité blanc (NH_4Cl , chlorure de pyridinium, etc...). Du liquide supérieur clair, prélever 100 μ l à la seringue et les introduire dans le tube contenant les tocophérols et l'étalon. La mise en solution est facilitée en inclinant le tube et en lui imprimant un mouvement de rotation sur lui-même. Attendre 5 minutes avant de chromatographier.

2. Chromatographie. Colonne (voir matériel). Températures four 240°C, injecteur-détecteur 250°C ; Gaz : azote 0,85 B, hydrogène 20 ml/mn, air 400 ml/mn. On injecte 1 μ l du mélange précédemment préparé et, dans ces conditions, le squalane sort au bout de 10 minutes. Atténuation 64 puis 8.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) M. WALBECQ
Thèse de Doctorat d'Université, Paris 1966
- (2) E. MEISSL, F. BOCKLER
Monatshefte für Chemie (1883) 4, 365
- (3) T. KLOBB, A. BLOCK
Bull. Soc. Chim. (1907) 1, 422
- (4) A. WINDAUS, A. WELSCH
Ber. (1909) 42, 612-16
- (5) J. ALLAN, V.W. MOORE
Soc. Chem. Ind. (London) (1927) 48, 2976
- (6) K. BONSTED
Z. Physiol. Chem. (1928) 176, 269-281
- (7) E. FERNHOLZ, H.B. Mac PHILLAMY
J. Am. Chem. Soc. (1941) 63, 1155-56
- (8) A. BARENTHER
Chem. Umschau. Geb. Fette Ole Wachse (1923) 30, 117
- (9) M.H. STERN, C.D. ROBESON, L. WEISLER, J.G. BAXTER
J. Am. Chem. Soc. (1947) 9, 869-74
- (10) G. NAKAMIYA
Sci. Papers Inst. Phys. Chem. Res. (Tokyo) (1935) 28, 16
Chem. Abstr. (1936) 30, 315
- (11) H.R. KRAYBILL, M.H. THORNTON, K.E. ELDRIGE
Ind. Eng. Chem. (1940) 32, 1138
- (12) A. MATAGRIN
Ind. Agr. Alim. (1950) 67, 449
- (13) A. UZZAN
Annales Nutrition et Alimentation (1959) XIII (2) A, 389-416
- (14) K.F. MATTIL
J. Amer. Oil Chemist's Soc. (1947) 24, 243-246
- (15) W.G. TAYLOR
J. Amer. Oil Chemist's Soc. (1949) 26, 413-418
- (16) R.L. HOFFMANN, H.A. MOSER, C.D. EVANS, J.C. COWAN
J. Amer. Oil Chemist's Soc. (1962) 39, 323-327
- (17) C.D. EVANS, J. OSWALD, J.C. COWAN
J. Amer. Oil Chemist's Soc. (1964) 41, 406
- (18) J. HARADA, Y. SARATANI, M. ISHIKAWA
Chem. Abstr. (1965) 62, 9 64b
- (19) H.P. KAUFMANN
Fette Seifen Anstr. (1950) 52, 35-8
- (20) H. NIEWIADOMSKI, J. SAWICKI
Fette Seifen Anstr. (1964) 66, 930
- (21) H. NIEWIADOMSKI, J. SAWICKI
Fette Seifen Anstr. (1966) 68, 641
- (22) J.P. MELCION
Travail de fin d'année, ESAGG, Paris, 1966
- (23) A. RUTKOWSKI, G. JACINI, P. CAPELLA, M. CIRIMELE
Riv. Ital. Sest Grasse (1966) 43, 89

- (24) E. ANDRE, M. MAILLE
Ann. Techn. Agr. (1956) 4, 557-70
- (25) A.H. ALLEN, W. THOMSON
Chem. News (1881) 43, 267
- (26) Norme Française NF T 60-205
- (27) N.F. DUBINSKAYA
Chem. Abstr. (1959) 53, 86665a
- (28) E. FEDELI, A. LANZANI, P. CAPELLA, G. JACINI
J. Amer. Oil Chemist's Soc (1966) 43, 254-6
- (29) E. FEDELI, A. LANZANI, G. JACINI
Riv. Ital. Sost Grasse (1966) 43, 509-11
- (30) H. JACKY
Oléagineux (1958) 13, 149-51
- (31) N.V. VOROB'EV
Sb. Rab. Maslich Efiromaslich Kult. (1966) 1, 36-41
- (32) J.P. WOLFF
Manuel d'analyse des corps gras, Azoulay, Paris, 1968
- (33) Official and Tentative Methods of the American Oil Chemist's Society 2 d. Ed. Chem. Abst. (1958) 40, 6a, AOCs Ed. Chicago
- (34) P. CAPELLA, G. DE ZOTTI, G.S. RICCA, A.F. VALETINI
Riv. Ital. Sost Grasse (1961) 38, 198-202
- (35) Analytical Methods Committee
Analyst (1959) 84, 356-72
- (36) D.P. SCHWARZ
J. Amer. Oil Chemist's Soc. (1966) 43, 472-3
- (37) T.P. HILDITCH
The Chemical Constitution of Natural Fats 572, Chapman and Hall Ed. Londres 1956
- (38) E. UCCIANI, J. CHANET, F. BUSSON
Oléagineux (1963) 18, 18
- (39) J.H. LEVY, A. LIFSHITZ
J. Ass. Off. Agr. Chem. (1967) 50, 1340-2
- (40) B. DE VRIES, G. JURRIENS
Fette Seifen Anstr. (1963) 65, 725
- (41) E. STAHL
Archiv. Pharmazie (1959) 64, 411
- (42) M. LOURY
Jnées Inf. ITERG, Paris 1968, p. 59
- (43) C.D. HICKMANN
Ind. Eng. Chem. (1957) 29, 968
- (44) N.I. KOZIN
Chem. Abstr. (1957) 51, 1627_e
- (45) C.D. EVANS, J. OSWALD, J.C. COWAN
J. Amer. Oil Chemist's Soc. (1964) 41, 406-11
- (46) H. NIEWIADOMSKI
Nahrung (1960) 4, 650-60
- (47) N.I. KOZIN, M.S. KOSTORNYH
Maslob Zr. Prom. (1964) 30, 11

- (48) J. HOLLO, E. KURUCZ, A. BARODI
Fette Seifen Anstr. (1964) 66, 936
- (49) T.P. HILDITCH
J. Soc. Chem. Ind. (1940) 60, 258
- (50) H.H. YOUNG, E.F. CHRISTOPHER
US. Pat 2,528,482 (31 octobre 1955)
- (51) V.P. PETROVSKII, V.N. KOMAROVA
Chem. Abstr. (1958) 52, 19181d
- (52) G. JACINI, E. FEDELI, A. LANZANI
J. Ass. Off. Agr. Chem. (1967) 50, 84-90
- (53) J.P. WOLFF, M. WALBECQ
Les constituants de l'insaponifiable, Jnées Inf. ITERG,
Marseille 1965, p. 27
- (54) F. CRUZ AUNON
Bol. Inst. Na. Invest Agro. (Madrid) (1955) 15, 187
- (55) J. EISNER, D. FIRESTONE
J. Ass. Off. Agr. Chem. (1962) 45, 337-42
- (56) M. NAUDET, F. MOROT SIR, G. COSTE
Rev. Fse Corps Gras (1969) 16, 259-268
- (57) P. CAPELLA
J. Amer. Oil Chemist's Soc. (1960) 37, 564
- (58) C.H. BRIESKORN
Archiv. Pharm. (1966) 299, 663-70
- (59) F. KNAPP, P. AEXEL
J. of Science Food (1968) 33, 159-62
- (60) H.K. MANGOLD, D.C. MALINS
J. Amer. Oil Chem. Soc. (1960) 37, 383-85
- (61) P. CAPELLA, E. FEDELI, M. CIRIMELE, A. LANZANI
Riv. Ital. Sost Grasse (1960) 40, 660
- (62) A. KARLESKIND
Thèse de Doctorat d'Université, Paris 1968
- (63) G. JURRIENS
Chem. Weekblad (1965) 61, 257-64
- (64) J. AVIGNAN, W.S. GOODMAN, D. STEINBERG
J. Lipid Res. (1963) 4, 100
- (65) C.P. FREEMANN, D. WEST
J. Lipid Res. (1966) 7, 324-7
- (66) H.O. SCHMIDT, L.L. JONES, H.K. MANGOLD
J. Lipid Res. (1967) 8, 423-30
- (67) R.A. DE ZEEUV
J. of Chromat. (1968) 32, 43-52
- (68) M. BRENNER, A. NIEDERWIESER
Experientia (Bâle) (1961) 17, 237
- (69) E. STAHL
Thin-Layer Chromatography. Ed. Springer, Berlin 1969, 2e éd.
- (70) O.S. PRIVETT, M.L. BLANK, D.V. GODDING, E.C. NICKELL
J. Amer. Oil Chemist's Soc. (1965) 42, 382-93
- (71) A. KUKSIS
Chromat. Rev. (1966) 8, 172-207
- (72) V.P. SKIPSKI, J.H. GOOD, M. BARCLAY, R.B. REGGIO
Biochem. Biophys. Acta (1968) 152, 10-19

- (73) J.J. PEIFER
Mikrochim. Acta (1962), 529
- (74) M.L. BLANCK, J.A. SCHMIDT, P.S. PRIVETT
J. Amer. Oil Chemist's Soc. (1964) 41, 371-76
- (75) E. FEDELI, F. CAMURATI
Riv. Ital. Sost Grasse (1969) 45, 97-101
- (76) O.S. PRIVETT, M.L. BLANCK
J. Amer. Oil Chemist's Soc. (1962) 39, 520
- (77) C.M. VAN GENT
Congrès International des Méthodes de Séparation, Heidelberg (1967), 344-50
- (78) D.C. LEEGWATER
Can. J. Physiol. (1962) 40, 847
- (79) H.P. KAUFMANN, K.O. MUKHERIGE
Fette Seifen Anstr. (1965) 67, 183-7
- (80) M. NAUDET, J. PASERO, S. BIASINI
Rev. Fse Corps Gras (1965) 12, 523-34
- (81) R. GUILLAUMIN, J.F. PERTUISOT
Rev. Fse Corps Gras (1968) 15, 85-91
- (82) G. HESSE
Angew. Chem. (1952) 64, 105
- (83) D. JONES, D.E. BOWYER, G.A. GRESHAM, A.N. HOWARD
J. of Chromat. (1966) 24, 226-7
- (84) H. RONDELET
Chrom. Symp. III Bruxelles (1964), 211
- (85) D.T. DOWING
J. of Chromat. (1968) 38, 91-99
- (86) G.R. WALLER
Progress in the chemistry of fats and other lipids
Vol. X. Part 2. Pergamon Press, p. 128
- (87) T.W. GODDWIN
Biosynthetic Pathways in Higher Plants
JB. Pridham and T. Swain eds. p. 57. London Academic Press (1965)
- (88) G. OURISSON
Cte Rendu Acad. Sciences (1964) 259 - 2284
- (89) P. BENYENISTE, L. HIRTH, G. OURISSON
Phytochem. (1966) 5, 31-45
- (90) P. CAPELLA, E. FEDELI, M. CIRIMELE, G. JACINI
Atti del VII Congresso Ital. di Studi Sulle Sost Grasse Trieste
(1964) C 31-1
- (91) M. NAUDET
Les sous-produits de l'huilerie
Jnées Inf. ITERG, Paris 1964, P. 46
- (92) A. KUKSIS
Biochem. (1964) 3, 1086
- (93) R. DONIA, A. OTT, C. DRAKEN
Anal. Chem. (1957) 29, 464
- (94) T. YAMADA
Yukagaku (1964) 13, 321-4
- (95) H. JASPERSON, R. JONES
J. Soc. Chem. Ind. (1947) 66, 13-17
- (96) P. CAPELLA, E. FIDELI, M. CIRIMELE, G. JACINI
Riv. Ital. Sost. Grasse (1963) 40, 603-6

- (97) DEUEL
The Lipids. Vol. I. Chemistry (1951), 400-404
Interscience Publishers Inc. New-York
- (98) G. GRIMMER, A. HILDEBRANDT
Chem. and. Ind. (London) (1967) 47, 2000-2
- (99) K.B. MARKLEY
Archiv. Bioch. Biophys. (1954) 48, 102
- (100) M.K. GOVIND RAO, K.T. ACHAYA
J. Amer. Oil Chemist's Soc. (1968) 45, 296
- (101) F. MORDRET, C. DE HAUT
Rev. Fse Corps Gras (1968) 15, 605
- (102) Methods of Analysis of the AOAC (1960), 373-4
- (103) R. FUHRMANN
Rev. Fse Corps Gras (1955) 2, 237-236
- (104) A. BARENTHER
Chem. Umschau. Gev. Fette Ole Wachse (1923) 30, 117
- (105) V.P. RGECHIN, V.N. KRASSILNIKOV, T.V. KARASSEVA,
N.A. NEDATCHINA, E.I. GORGHKOVA
Masl. Gir. Pro. (1968) 7, 13
- (106) F.R. EARLE, S.B. DETWILER
Oil and Soap (1941) 18, 117
- (107) R. GUILLAUMIN, N. DROUHIN
Rev. Fse Corps Gras (1966) 13, 21-28
- (108) K. TSUDA
Ber. (1938) 71, 790-97
- (109) J. ZIMMERMANN
Helv. Chem. Acta (1943) 26, 642-47
- (110) T. TAMURA, S. TAMI, T. MATSUMOTO
Chem. Abstr. (1960) 54, 23372h
- (111) G. JACINI, P. CAPELLA
Riv. Ital. Sost. Grasse (1962) 39, 620-23
- (112) A.S.L. TIRIMANNA, R.L. WICKREMASINGHE
Tea. Quart. (1966) 37, 134-39
Chem. Abstr. (1967) 66, 45601a
- (113) P. BOITEAU, B. PASICH, A. RAKOTO RATSIMAMANGA
Les terpénoides en physiologie végétale et animale
Gauthier - Villars, Paris 1964
- (114) J.D. JOHNSTON, F. GAUTCHI, K. BLOCH
J. Biol. Chem. (1957) 224, 185
- (115) H. CHAVERON
Rev. Fse Corps Gras (1967) 14, 21-27
- (116) J.P. WOLFF
Jnées Inf. ITERG, Paris 1968, p. 171
- (117) R. IKAN
J. Chromat. (1965) 17, 591-593
- (118) G. PONSINET, G. OURISSON
Phytochemistry (1965) 4, 799-804
- (119) A. TSUDA S. AKAGI, Y. KISHIMA
Chem. Pharm. Bull. Tokyo (1958) 6, 101
- (120) D.F. JOHNSON, R.D. BENNETH, E. HEFTMANN
Science (1963) 140, 198

- (121) M. DEVYS, M. BARBIER
C.R. Acad. Sci. (1965) 261, 4901
- (122) J.H. RECOURT, R.K. BERTHUIS
Fette Seifen Anstr. (1963) 65, 619
- (123) P. CAPELLA, G. LOSI
Ind. Agrarie (1968) 6, 277-282
- (124) N. AKHTAR, S. MARSH
Biochem. J. (1967) 102, 462
- (125) M. DEVYS, A. ALCAIDE, M. BARBIER
Bull. Soc. Chim. Biol. (1968) 50 (10), 1751
- (126) B.A. KNIGHTS
Mem. Soc. Endocrinal (1966) 16, 211
- (127) M. LINDE, N. ERGENC, K. MEYER
Helv. Chim. Acta (1966) 49, 1246
- (128) W. KLYNE
La chimie des stéroïdes. Gauthier-Villars, Paris 1966
- (129) X -Bull. Soc. Chim. Biol. (1969) 51, 819
- (130) T. KIRIBUCHI, T. MIZUNAGA, S. FUNAHASI
Agr. Biol. Chem. (1966) 30, 770
- (131) J.W. COPIUS-PEERBOOM
Chromatographic Sterol analysis as applied to the investigation of
milk fat and other oils and fats. Pudoc 1963
- (132) P.R. MORE, C.A. BAUMANN
J. Biol. Chem. (1952) 195, 615
- (133) J.L. JOHNSON
Anal. Chem. (1957) 29, 468
- (134) J.W. COPIUS-PEERBOOM, H.W. BEEKES
J. of Chromat. (1965) 17, 99-113
- (135) H.E. VROMAN, C.F. COHEN
J. Lipid Res. (1967) 8 150-2
- (136) R. KAMMERECK, WEN-HUI LEE, A. PALIOKAS, G.J. SCHROEPPER
J. Lipid Res. (1967) 8, 282-4
- (137) J.P. ALLAIS, M. BARBIER
Qualitas Plantarum Mat. Vog. (1968) 12, 215-22
- (138) A. SEHER
Fette Seifen Anstr. (1968) 70, 481
- (139) R.K. BERTHUIS, J.H. RECOURT
Colloques internationaux de Marseille, Juillet 1960
Nature (1960) 186, 372-4
- (140) W. VAN DEN HEUVEL, E.C. HORNING
Bull. Soc. Chim. Biol. (1965) 47, 945-977
- (141) J. EISNER, N.P. WONG, D. FIRESTONE, J. BOND
J. Ass. Off. Agr. Chem. (1962) 45, 337-42
- (142) A. KARLESKIND, F. AUDIAU, J.P. WOLFF
Rev. Fse Corps Gras (1965) 12, 399-403
- (143) A. ROZANSKI
Anal. Chem. (1966) 38, 36-40
- (144) A. PREVOT, C. BARBATI
Rev. Fse Corps Gras (1968) 15, 157-165
- (145) P. DUPERON
C.R. Acad. Sci. Paris (1967) 265 (50), 409-11

- (146) D. KRITCHEVSKY
Food Sci. (1967) 23, 64-66
- (147) J. GRACIAN, J. MARTEL
Grasas y Aceites (1969) 20, 231
- (148) M. DEVYS, M. BARBIER
Bull. Soc. Chim. Biol. (1967) 49, 865-71
- (149) B.A. KNIGHTS
J. of Gas Chromat. (1967) 5, 273-82
- (150) R.M. SILVERSTEIN, G. CLAYTON BASSLER
Identification spectrométrique des composés organiques
Masson et Cie, Paris 1968
- (151) J.D. BARHARDT, L. HIRTH, G. OURISSON
Phytochem. (1967) 6, 815
- (152) R. AEXEL, S. EVANS, M. KELLY, N.J. NICHOLAS
Phytochem. (1967) 6, 511
- (153) M. BARBIER
Rev. Fse Corps Gras (1966) 13, 332-33
- (154) A. WEIZMANN, Y. MAZUR
J. Org. Chem. (1958) 23, 832
- (155) A. KUKSIS, J.M.R. BEVERIDGE
J. Lipid. Res. (1960) 1, 311-20
- (156) L. MUCAM
Thèse de Doctorat d'Université, Strasbourg 1969
- (157) L.N. NORCIA
J. Amer. Oil Chemist's Soc. (1966) 43, 168
- (158) S. HUNECK
J. of Chromat. (1962) 7, 564-7
- (159) T. MURAKAMI, H. ITOKAWA, F. UZUKI, N. SAVADA
Chem. Pharm. Bull. Tokyo (1965) 13, 1346
- (160) J. MAC LEAN, J.B. THOMSON
Archiv. Pharm. (1962) 295, 865-8
- (161) C. MATHIS
Ann. Pharm. Fses (1965) 23, 331-34
- (162) R. IKAN
J. of Chromat. (1964) 14, 275
- (163) P. KARRER, E. JUCKER
Carotinoide Verlag, Birkhäuser, Bâle 1948
- (164) B.H. DAVIES
Analysis of carotenoid Pigments dans T.W. GOODWIN Chemistry and
Biochemistry of Plant Pigments. Academic Press London (1965), 461
- (165) J. SROUR
Travail de fin d'année, ESAGG, Paris 1968
- (166) M. DURKEE
Ind. Engng. Chem. (1936) 28, 898
- (167) R. SHOLFIELD, H.J. DUTTON
J. Amer. Oil Chemist's Soc. (1954) 31, 258
- (168) MINGOT
An. Inv. Agron. (1956) 5, 295
- (169) H. NIEWIADOMSKI, J. BRATKOWSKA
J. Amer. Oil Chemist's Soc. (1965) 42, 731-34
- (170) G. BOX, H.A. B.A. BOCKENOOGEN
Fette Seifen Amstr. (1967) 69, 724-29

- (171) C. PAQUOT, J. MERCIER, A. MATHIEU, D. LEFORT, R. PERRON
Les méthodes analytiques des lipides simples.
Ed. CNRS; Paris 1962
- (172) E. BENK, L. BRIXIUS
Fette Seifen Anstr. (1965) 67, 65-9
- (173) I.G. MOKHNACHEV, L.G. SERDYUK
IZV Vysshikh Uchebn Zavedenii Pishchevaya Tekhnol. (1962)
- (174) A. DAGHETTA, A. FARINI, D. GRIECO
Riv. Ital. Sost. Grasse (1967) 44, 1-6
- (175) H.H. STRAIN
J. Biol. Chem. (1934) 105, 523-36
- (176) H.M. EVANS, K.S. BISHOP
J. Metabolic Res. (1922) 1; 319-35
- (177) R.H. BRUNNELL, J.P. KEATING, A.J. QUAPESIMO
J. Agr. Food Chem. (1968) 16, 659
- (178) J. BALTES
Wiss. Veröffent. Deut. Ges. Ernährung (1967) 16, 169-177
- (179) J. GREEN, D. Mc HALE, P. MANAUS, S. MARCINKIEWICZ
J. Chem. Soc. (1959), 3362
- (180) Anon. Biochim. Biophys. Acta (1965) 107, 1-4
- (181) J.F. PENNOCK, F.W. HEMMING, J.D. KEPR
Biochem. Biophys. Res. Commun (1964) 17, 542
- (182) P.J. DUNPHY, K.J. WHITTLE, J.F. PENNOCK dans T.W. GODWIN
Biochemistry of Chloroplasts, Academic Press London 1966,
vol. 1, p. 165
- (183) J. JANICKI, D. OLEJNIK
Qualitas Plantarum Mater. (1968) 16, 230
- (184) E. LEEPBECK, E. SONDERGAARD, H. DAM
Acta Chem. Scand. (1967) 21, 2382
- (185) G. SHONE
Chem. and Ind. (London) (1963) 8, 335-6
- (186) MAC HALE, J. GREEN
Chem. and Ind. (London) (1963) 8, 982
- (187) H.H. DRAPER, A.S. CSALLANY
Lipids (1967) 2, 47
- (188) W.A. SKINNER
Biochem. Biophys. Res. Comm. (1964) 15, 460
- (189) J. LARS, G. NILSSON
Acta Chem. Scand. (1968) 22, 200-16
- (190) J. LARS, G. NILSSON, H. SIEVERTSSON, H. SELANDER
Acta Chem. Scand. (1969) 23, 859
- (191) A. MORTON
Wiss. Veröffent. Deut. Ges. Ernährung (1967), 16, 1-13
- (192) P.D. BOYER
J. Am. Chem. Soc. (1951) 73, 733
- (193) A. EMMERIE, C. ENGEL
Rec. Trav. Chem. Pays-Bas Belg. (1939) 58, 283
- (194) D.D. HONNOLD, K.M. BROBST, TAI-MAN
J. Amer. Oil Chem. Soc. (1969) 46, 339-40
- (195) C.C. TSEN
Anal. Chem. (1961) 33, 849-51

- (196) H.B. SCHMIDT
Fette Seifen Anstr. (1967) 69, 913-16
- (197) M. FURTER, R.F. MEYER
Helvet. Chim. Acta (1939) 22, 240
- (198) I. HARADA, X. SARATANI, M. ISHIKANA
Nipon Nageikagaku Kaishi (1960) 34 (10), 800-7
- (199) A.S. CSALLANY, H.H. DRAPER
J. Biol. Chem. (1963) 238, 2912
- (200) D.R. NELAN, C.D. RODESON
Nature (London) (1962) 193, 477
- (201) J. LARS, G. NILSSON, H. SIEVERTSSON, H. SELANDER
Acta Chem. Scand. (1969) 23, 268-278
- (202) V.I. KOLTUNOVA
Chem. Abstr. (1961) 55, 8893b
- (203) A. NIEDERSTEBRUCH, I. HINSH
Fette Seifen Anstr. (1967) 69, 559
- (204) Anon. Analyst (1959) 84, 356-72
- (205) K. TAUFEL, R. SERZISKO
Die Nahrung (1963) 7, 606-11
- (206) M. FLANZY, P. DUBOIS
Ann. Technol. Agr. (1964), 3, 67
- (207) A. SEHER
Mikrochim. Acta (1961) 2, 308-13
- (208) H.D. STOWE
Archiv Biochem. Biophys. (1963) 103, 42-44
- (209) M.K. GOVIND RAO, S. VENKOB RAO, K.T. ACHAYA
J. Sci. Food Agr. (1965) 16, 121-4
- (210) K.J. WHITTLE, J.F. PENNOCK
Analyst (1967) 92, 423-30
- (211) M. JACKY
Die Nahrung (1967) 11, 679-83
- (212) W. WILSON, E. KODICEK, H. BOOTH
Biochem. J. (1962) 84, 324-31
- (213) P.P. NAIR, D.A. TURNER
J. Assoc. Off. Anal. Chem. (1963) 40, 353-56
- (214) D.A. LIBBY, A. SHEPPARD
J. Assoc. Off. Anal. Chem. (1964) 47, 371-76
- (215) H.T. SLOVER, L.M. SHELLEY, T.L. BURKS
J. Amer. Oil Chem. Soc. (1967) 44, 161-66
- (216) J.P. NELSON, A.J. MILUN
J. Amer. Oil Chem. Soc. (1968) 45, 848-51
- (217) H.T. SLOVER, J. LEMMAN, R. VALIS
J. Amer. Oil Chem. Soc. (1969) 46, 417-20
- (218) M.W. DICKS-BUSHNELL
J. of Chromat. (1967) 27, 96 103
- (219) H.E. SCHMIDT
Fette Seifen Anstr. (1968) 70, 63-68
- (220) M. JAKY
Fette Seifen Anstr. (1967) 69, 507-11
- (221) M. KOMODA, I. HARADA
J. Amer. Oil Chem. Soc. (1969) 46, 18-22

DEUXIEME THESE
(Propositions données par la Faculté)

DOSAGE DES TRACES METALLIQUES DANS LES CORPS GRAS PAR
SPECTROPHOTOMETRIE D'ABSORPTION ATOMIQUE

Permis d'imprimer

Vu et approuvé
Paris, le 27 Juillet 1971

Le Président de l'Université de Paris VI

A. HERPIN

